DIE VERWENDUNG EINES *ELISA* ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN DEN ERREGER DER AVIÄREN ENCEPHALOMYELITIS

SUNANTHA KUHAVANTA

Diss. München
1984

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof.Dr.Josef Kösters

Die Verwendung eines ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen den Erreger der Aviären Encephalomyelitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Sunantha Kuhavanta
aus Bangkok/Thailand

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakul -
tät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. J. Kösters

Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. R. Hoffmann

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1	Krankheitsbild und Ätiologie	2
2.2	Serologische Untersuchungsmöglichkeiten	5
2.2.1	Serumneutralisation	5
2.2.2	Embryoempfänglichkeitstest	6
2.2.3	Komplement-Bindungs-Reaktion	6
2.2.4	Direkte Immunofluoreszenz	7
2.2.5	Indirekte Fluoreszenz-Antikörpertechnik	7
2.2.6	Agar-Gel-Präzipitation	7
2.3	ELISA beim Huhn	9
2.3.1	Das ELISA-Prinzip zum Nachweis von Antikörpern	11
2.3.1.1	Adsorptionsreaktion (Sensibilisierung, Beschichten, Coating)	11
2.3.1.2	Antigen-Antikörper-Reaktion	11
2.3.1.3	Konjugat-Reaktion	12
2.3.1.4	Substratreaktion	12
2.3.1.5	Reaktionsabbruch	12
2.3.1.6	Messen der Farbintensität im Photometer	12
2.3.1.7	Waschen	13
2.4	Anwendung des ELISA bei verschiedenen Krankheitserregern	13

Inhaltsverzeichnis Seite

2.5	Direkter Antigennachweis mit der ELISA-Methode	17
3.	Material und Methode	19
3.1	Antigen	19
3.1.1	Virusstamm	19
3.1.2	Virusvermehrung und Titration	19
3.1.3	Antigenherstellung	19
3.1.3.1	Herstellung des AEV-Antigens	19
3.1.3.2	Herstellung des Kontroll-Antigens	20
3.1.3.4	Reinigung und Konzentrierung der Antigene	20
3.2	Seren	21
3.2.1	AEV-antikörperhaltige und -verdächtige Seren	21
3.2.2	Antikörperfreie Seren	21
3.2.3	Serum - Reinigung	21
3.3	Dotter	21
3.3.1	AEV-antikörperhaltige Dotter	21
3.3.2	Antikörperfreie Dotter	22
3.4	Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)	22
3.4.1	Herstellung der verwendeten Lösungen	22
3.4.1.1	Antigen-Adsorptionsmedium (Coating puffer)	22
3.4.1.2	Waschlösung (PBS/Tween pH 7,4)	22

Inhaltsverzeichnis Seite

3.4.1.3	Serum und Konjugat-Inkubations-medium	23
3.4.2	Konjugat	23
3.4.3	Substrat	23
3.4.4	Photometrische Messung	23
3.4.5	ELISA-Platten	23
3.4.6	Durchführung des ELISA	24
3.4.7	Kontrollen	26
3.4.8	Auswertung der Ergebnisse	26
3.5	Weitere Methoden zum Antikör - pernachweis	26
3.5.1	Embryoempfänglichkeitstest	26
3.5.2	Agar-Gel-Präzipitation	26
3.5.3	Serum-Neutralisation	27
4.	Versuchsergebnisse	28
4.1	Schachbrett-Titration zur Be - stimmung der optimalen Antigen-konzentration	28
4.2	Haltbarkeit und Lagerfähigkeit der mit AEV-Antigen beschichte - ten ELISA-Platten	30
4.3	Vergleichende Untersuchung über den Verlauf der Antikörper nach Immunisierung gegen AEV mittels ELISA, AGP und SN	30

Inhaltsverzeichnis Seite

4.4	Ergebnis der Serum-Neutralisation	39
4.5	Vergleichender Antikörpernachweis aus dem Dotter mittels ELISA und dem EET	39
5.	Besprechung der Ergebnisse	44
6.	Zusammenfassung	46
7.	Literaturverzeichnis	49

1. Einleitung

Die aviäre Encephalomyelitis (AE) ist eine Viruskrankheit, die bei jungen Hühnerküken schwere Verluste hervorrufen kann. Bei erwachsenen Hühnern kommt es nach einer Infektion mit dem Erreger zu unterschiedlich starken Rückgängen der Legeleistung. Eine Impfprophylaxe ist möglich, wird jedoch meist nur in Zucht- und Vermehrungsbetrieben durchgeführt. Die Anzüchtung des Erregers zur Diagnosestellung gelingt nur über das antikörperfreie embryonierte Hühnerei. Geeignete Gewebekultursysteme sind bislang nicht gefunden. Deshalb stützt sich die Diagnosestellung sowie die Impferfolgskontrolle gewöhnlich auf serologische Nachweisverfahren. Zum Antikörpernachweis werden folgende serologische Methoden benutzt:

Serumneutralisation (SN) im bebrüteten Hühnerei, Embryoempfänglichkeitstest (EET) bei Zucht- und Vermehrungsherden, Agar-Gel-Präzipitation (AGP), Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR), direkte und indirekte Immunofluoreszenz (IF).
In der Praxis bewährt haben sich eigentlich nur der SN und der EET. Beide Verfahren sind auf embryonierte Hühnereier angewiesen, die beim SN-Test spezifisch pathogenfrei sein müssen. Darüberhinaus ist die Beobachtungsdauer der inokulierten Eier mit ca. 2 Wochen bis zur Feststellung des Ergebnisses zu zeitaufwendig. Im EET können nur Zuchtbestände zum Zeitpunkt der Zuchtreife untersucht werden.

Seitdem der Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) von ENGVALL und PERLMAN (1971) entwickelt wurde, hat man diese Methode mit vielen parasitären, bakteriellen und viralen Antigenen durchgeführt. Die meisten Autoren sind der Auffassung, daß die ELISA-Methode eine hohe Sensibilität und Spezifität besitzt sowie einfach durchzuführen ist.

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein ELISA für den Nachweis von AEV-Antikörpern entwickelt und geprüft werden, ob er sich für die Routineuntersuchung eignet.

2. Literaturübersicht

2.1 Krankheitsbild und Ätiologie

Die aviäre Encephalomyelitis (AE) ist eine Infektionskrankheit, die meist bei jungen Hühnerküken vorkommt. JONES (1932) beobachtete erstmals diese Krankheit bei zwei Wochen alten Rhodeländer-Küken. Wegen einer auftretenden Schüttellähmung wurde die Krankheit epidemic tremor genannt (JONES 1934). In den folgenden Jahren verbreitete sie sich über die USA. Van ROEKEL et al. (1938, 1939) bezeichneten sie als Aviäre Encephalomyelitis. Diese Bezeichnung wurde von dem Committee on Poultry Disease Nomenclature of the American Veterinary Medical Association anerkannt. In der Folge wurde die Krankheit in West- und Nordeuropa und in praktisch allen Teilen der Welt festgestellt. GROTH und GREUEL (1961) beschrieben ihr erstmaliges Auftreten in Westdeutschland. Außer bei Hühnerküken fand man später natürliche Ausbrüche der Krankheit bei Fasanen (MATHEY 1955), Rebhühnern (HILL und RAYMOND 1962) und Truthühnern (HOHLSTEIN et al. 1970; KALETA et al. 1975).

SCHAAF und LAMOREUX (1955) waren der Auffassung, daß es keine Erregerübertragung über das Brutei gibt. Später stellten jedoch TAYLOR et al. (1955) sowie CALNEK et al. (1960) fest, daß eine solche Übertragung vorkommt. Eine Ausbreitung erfolgt hauptsächlich im Brutschrank und in den Aufzuchtbatterien. Nach Eiübertragung beginnt die Krankheit im Laufe der ersten Lebenswoche bzw. direkt mit dem Schlupf. Einem Teil der Küken gelingt es noch, die Schale anzupicken, sie bleiben jedoch in der Schale stecken. Geschlüpfte Küken sind oft apathisch, ein Teil geht unter Durchfallserscheinungen ohne andere Symptome innerhalb weniger Tage ein. Es werden vermehrt Küken beobachtet, die eine verklebte Kloake aufweisen. Die Inkubationszeit der Krankheit bei Küken, die durch Kontakt infiziert wurden, beträgt minimal 11 Tage (CALNEK et al. 1961). Bei Krankheitsausbruch beobachtet man zunächst Schlafsucht und Teilnahmslosigkeit. Charakteristisch für die Krankheit ist ein unsicherer ataktischer Gang. Lähmungserscheinungen treten von einfachen Paresen bis zur vollständigen

Paralyse auf. Selten wird das charakteristische Zittern, nach dem die Krankheit zunächst epidemic tremor genannt worden war, beobachtet. Verstärkt wird dieses Zittern, wenn man verdächtige Tiere in die Hand nimmt und auf- und abbewegt. Die Morbidität erreicht im allgemeinen nach 11 Tagen den höchsten Stand und sinkt danach langsam ab. Sie schwankt zwischen 40 und 60 %, die Mortalität liegt im Durchschnitt bei 25 % und kann bis zu 50 % ansteigen (LUGINBUHL und HELMBOLDT 1978). Die Tiere entwickeln sehr schnell eine Altersresistenz gegen die Krankheit. Junghennen und erwachsene Hühner erkranken klinisch nicht, erwerben aber durch die Infektion ebenso wie die überlebenden Küken erkrankter Herden eine lebenslängliche Immunität. In AE-durchseuchten Herden können lediglich Linsentrübungen an einem oder beiden Augen als Spätfolge beobachtet werden (PECKHAM 1957; BARBER und BLOW 1963; BERGMANN 1970). Trotz Fehlen klinischer Anzeichen reagieren legende Hennen auf eine Durchseuchung mit dem AE-Virus mit einem unterschiedlich starken Leistungsabfall. So stellt TAYLOR et al. (1955) fest, daß die Legeleistung um 50 % zurückging, sich jedoch innerhalb von 1 Woche wieder erholte. SUMNER et al. (1957b) berichteten über einen natürlichen AE-Ausbruch mit einem Rückgang der Legeleistung um ca. 35 % für ungefähr 6 Wochen. DORN und KRONTHALER 1964 führen aus, daß in 5 Herden der Rückgang der Legeleistung zwischen 10 und 38 % für einen Zeitraum bis zu zwei Wochen zu beobachten war. HEMSLEY (1964) fand in 36 Herden nach Einschleppung der AE eine durchschnittliche Minderung der Legeleistung von 10 % mit einer Erholungsphase zwischen 1 und 2 Wochen. Nach HALPIN (1967) sank die Leistung in 6 Herden durchschnittlich um 18 % für 15 Tage. RIGGENBACH (1965) beobachtete eine Minderung der Legeleistung zwischen 5 bis 20 %, die jedoch auf 50 % und darunter fallen kann und 12 bis 24 Tage anhält.

Der Sektionsbefund ergibt nur wenige charakteristische Merkmale der Krankheit. Häufig wird eine Kloakendilatation mit Obstipatio falsa festgestellt. Vielfach kommt es zu einer ockergelben Verfärbung der Leber. Bei Anschnitt der Muskelmagenmuskulatur können nach protrahiertem Verlauf dieser Krankheit weiße Stippchen in der Muskulatur festgestellt werden. Histologisch

lassen sich diese als lymphozytäre Zellansammlungen identifi - zieren, die man auch im Pankreas und im Myocard, besonders in der Gegend des Atriums, feststellen kann (LUCAS 1951; GROTH und GREUEL 1961; SPRINGER und SCHMITTLE 1968). Charakteristische hi - stologische Veränderungen sind im Kleinhirn und im verlängerten Rückenmark zu beobachten. Sie bestehen aus Ganglienzelldegenera - tion, Randständigkeit des Zellkerns, besonders der Purkinjezel - len sowie strauchartige Gliawucherungen vor allem in der Mole - kularschicht des Kleinhirns. Besonders bei 2 bis 4 Wochen alten Küken gelingt der histologische Nachweis dieser typischen Ver - änderungen ohne Schwierigkeiten.

Der Erreger der AE gehört zu den kleinen Viren. OLITZKY und BAUER (1939) bestimmten seine Größe durch Filtration mit Gradocolmem - branen auf 20 bis 30 mμ. Später wurde dieses von KRAUSS und UEBERSCHÄR (1963) durch elektronenmikroskopische Untersuchung be - stätigt. BUTTERFIELD (1967) bestimmte durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten eine spezifische Dichte von 1,33 g/cm^3. MAYR und BÖGEL (1961) stellten fest, daß das AE-Virus chloro - formstabil ist. Nach MATHEKA et al. (1962) erwies sich der Erre - ger auch trypsinresistent, nach WALLIS und MELNICK (1962) wird die Vermehrungsfähigkeit durch Kationen stabilisiert. BUTTER - FIELD et al. (1969) bewiesen, daß AE-Virus in saurem Milieu von pH 2,8 für 3 Stunden und gegenüber Pepsin und Desoxyribonuklea - se resistent ist.
Aufgrund der Untersuchungen wird das AE-Virus heute zu den Pi - corna-Viren gestellt.
Untersuchungen über die Tenazität des Erregers ergaben, daß vi - rushaltiges Gehirnmaterial mit 50 % Glycerin mind. 69 Tage lang infektiös bleibt (JONES 1934). FEIBEL et al. (1952) lagerten das AE-Virus 428 Tage lang bei -20°C, ohne daß seine Infektiosität abnahm. CALNEK et al. (1961) gaben an, daß sich das AE-Virus in gefrorenem Zustand mind. 20 Jahre lang infektiös hält.

Der Erreger läßt sich durch Serienpassagen im embryonierten, an - tikörperfreien Hühnerei an dieses Kultursystem adaptieren. Sol - che embryoadaptierten Stämme sind vorwiegend neurotrop und las - sen sich auf Küken parenteral übertragen. Auf oralem Wege braucht

man wesentlich höhere Dosen. Die Vermehrung des AE-Virus erfolgt am besten durch Dottersackbeimpfung (JUNGHERR et al. 1956; WILLS und MOULTHROP 1956; SUMNER et al. 1957a; BURKE et al. 1965). Nur eiadaptierte Stämme rufen bei Embryonen aus antikörperfreien, empfänglichen Elterntierherden typische Veränderungen hervor, die durch Verminderung der Bewegung der Embryonen und ausgeprägte Muskeldystrophie charakterisiert sind. Feldisolate sind für Embryonen normalerweise nicht pathogen. Zur Impfung mit Lebendvaccine eignen sich nur kükenadaptierte Stämme, die nicht embryoadaptiert sind. Diese Impfstämme verhalten sich wie Feldisolate und sind für Küken unter 6 Wochen pathogen. BUTTERFIELD et al. (1969) stellten fest, daß es keinen Unterschied in den physikalisch-chemischen Eigenschaften und im serologischen Verhalten zwischen eiadaptierten (van ROEKEL-Stamm) und Feldisolaten des AE-Virus gibt. Feldstämme sind enterotrop, infizieren die Küken auf oralem Wege und werden mit dem Kot ausgeschieden.

Versuche zur in vitro-Vermehrung des Virus, z.B. in Neuroglia-zellkulturen (MANCINI und YATES 1967), Kükenembryonierenzellen (MANCINI und YATES 1968 b), Hühnerembryofibroblasten (MANCINI und YATES 1968 a), Hühnerembryohirnzellen (SATO et al. 1969, KAMADA et al. 1974) verliefen wenig zufriedenstellend. Der Erreger ruft in den genannten Systemen keine diagnostisch verwertbaren Veränderungen wie z.B. CPE hervor. Seine Vermehrungsrate ist gering.

2.2 Serologische Untersuchungsmöglichkeiten

Zur Diagnose und Kontrolle der AE-Virus-Infektion können verschiedene serologische Methoden angewendet werden.

2.2.1 Serumneutralisation (SN)

Im Jahr 1957 wurde die SN bei dem AE-Virus von SUMNER et al. zum ersten Mal benutzt und beschrieben. Bei dieser SN wurden konstante Serummengen mit den Virusverdünnungen zusammengemischt und intraokular in Hühnerembryonen injiziert. Diese Methode hatte den Nachteil, daß der Vorgang schwer durchführbar und die unspezifische Sterblichkeit sehr

groß ist. Um den Nachteil bei der SN von SUMNER et al. zu ver - meiden, entwickelten CALNEK und JEHNICH (1959) eine neue Me - thode. Dabei wurde das verdünnte Virus (mit van ROEKEL-Stamm infizierter Hirnsuspension) mit konstanten Serummengen in den Dottersack embryonierter Hühnereier injiziert. Nach 12-tätiger Beobachtung wurde die Motilität der Embryonen bei normaler Ent - wicklung der Muskulatur oder Muskeldystrophie nach der Methode von JUNGHERR et al. (1956) als Kriterium beurteilt. Diese SN eignet sich zur Verfolgung von Antikörperbewegung nach natür - lichen und künstlichen Infektionen. Der Nachteil dieser Methode ist der große Zeit- und Materialaufwand.

2.2.2 Embryoempfänglichkeitstest

SUMNER et al. (1957 b) hatten den EET zur Untersuchung der Im - munität bei Legeherden angewandt. Bei dieser Methode wurden die embryonierten Eier von verschiedenen Zuchtherden 6 Tage lang inkubiert und danach mit AE-Virus intraokulär injiziert. Die Eier wurden weiter 10-12 Tage bebrütet, geöffnet und die Em - bryonen auf Motilität geprüft. Wenn 100 % der Embryonen die cha - rakteristischen Veränderungen aufweisen, wird angenommen, daß die Herde empfänglich ist. Eine Herde gilt als immun, wenn weni - ger als 50 % Embryonen charakteristische Veränderungen aufwei - sen. Der EET, der heute mit Dottersackbeimpfung durchgeführt wird, eignet sich sehr gut zur Untersuchung des Immunstatus einer Legeherde. Diese Methode beschränkt sich jedoch auf Zuchtbestän - de mit Hahnenhaltung bzw. künstlicher Insemination und während der Legeperiode. Jungtier - und Ablegehaltungen können nicht er - faßt werden.

2.2.3 Komplement-Bindungs-Reaktion

SATO et al. (1969) versuchten ein AE-Virusantigen zu entwickeln, das für die KBR geeignet ist. Sie verwendeten dafür den embryo - adaptierten van ROEKEL-Stamm, den sie durch Dottersackinfektion von embryonierten Bruteiern vermehrten.
Das nach 13 Inkubationstagen gewonnene Gehirnmaterial wurde

verschiedenen Reinigungs- und Konzentrationsschritten unterwor - fen. Die Autoren stellten fest, daß das mit dieser Methode ge - wonnene Antigen qualitativ unterschiedlich ist und nur 4 Char - gen von 10 Zubereitungen benutzt werden konnten.

2.2.4 Direkte Immunofluoreszenz

Im Jahr 1970 verwendete van der HEIDE Fluorescein-markiertes An - tiserum zur Diagnose der AE bei künstlich infizierten Küken. Er stellte fest, daß diese Methode geeignet ist. LUKERT und DAVIS (1971) modifizierten sie zur Bestimmung des Immunstatus von Zuchthennen. Der Test hatte im Vergleich mit der SN eine Sensi - bilität von 73 % und eine Spezifität von 72 %.

2.2.5 Indirekte Fluoreszenz-Antikörpertechnik

CHOI und MIURA (1972) entwickelten eine indirekte IF zum Nach - weis der AE - Antikörper bei Hühnern.
Als Antigenträger benutzten sie Objektträger, die mit infizier - tem Hirnmaterial von Embryonen beschickt waren. Die Bindung spe - zifischer Hühnerantikörper gegen AE-Virus wurde mit Hilfe von Fluorescein-gekoppeltem Anti-Huhn-Globulin aus dem Kaninchen nachgewiesen. So konnte festgestellt werden, daß bei einem Neu - tralisationsindex von > 1 die Methode spezifisch eingesetzt wer - den kann.

BERGER (1982) benutzte ein System, bei dem als Antigen AE-Virus in Kükenembryo-Hirnzellkultur angezüchtet wurde.

2.2.6 Agar-Gel-Präzipitation

BUTTERFIELD et al. (1969) versuchten erst - mals einen AGP bei der AE anzuwenden. Als Virusantigen wurde infiziertes Gehirnmaterial verwendet, entweder unverdünnt oder in einer Verdünnung von 1:20. Auch nach einer Reaktionsdauer von einer Woche konnten sie keine Präzipitationsreaktionen gegen spe - zifische Seren feststellen. LUKERT und DAVIS (1971) modifizier -

ten die Antigenherstellung. Sie verwendeten ein Antigen, das 9 Tage nach der Infektion 5-tägiger embryonierter Eier aus Gehirnmaterial bzw. Gastrointestinal-Trakt gewonnen wurde. Das Gastrointestinalantigen ergab mit vielen Seren eine deutliche Präzipitationsreaktion. In den Untersuchungen von ULLOA (1980) wurde jedoch festgestellt, daß es sich hierbei um unspezifische Reaktionen handelt. Brauchbar erwiesen sich das von IKEDA (1977 a) entwickelte Antigen aus embryonalem infizierten Gehirnmaterial, das auf ein Zehntel bis ein Dreißigstel des Ausgangsvolumens konzentriert war. Darüberhinaus stellte IKEDA fest, daß die Kochsalzkonzentration im Agar-Gel eine entscheidende Bedeutung für die Deutlichkeit und Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes hat. Nach seinen Angaben liegt die günstigste Kochsalzkonzentration im Agargel zwischen 12,5 - 20 %. Aufgrund seiner Untersuchung kommt IKEDA (1977 b) zu der Aussage, daß die Mehrzahl der Seren bei einem Neutralisationsindex von 1 oder darüber auch im Agargel mit einem geeigneten Antigen reagiert, so daß man die Sensibilität der Agargel-Präzipitation genauso hoch veranschlagen kann wie die SN. Unter Verwendung eines nach IKEDA (1977 a) hergestellten und mit Fluorocarbon teilgereinigten Antigens konnte ULLOA (1980) die Beobachtung von IKEDA weitgehend bestätigen. Nach Impfversuchen stellte sich jedoch heraus, daß zwar kurz nach der Impfung bei einem Teil der Tiere zwischen der 1. und 2. Woche präzipitierende Antikörper nachgewiesen werden können, danach bis ca. zur 8. Woche post vacinationem jedoch keine präzipitierenden Antikörper in nachweisbarer Menge vorhanden waren. Ein Zusammenhang zwischen neutralisierenden Antikörpern und präzipitierenden war nicht deutlich.

GIRSHICK und CRARY (1982) erhielten mit ihrem Antigen Präzipitationslinien gegen Hyperimmunserum. Bei Überprüfung der Antikörperentwicklung nach künstlicher Infektion stellten sie fest, daß bereits 4 Tage nach der Infektion einige Tiere präzipitierende Antikörper aufwiesen, nach 7 Tagen waren es bereits 85 %, 11 und 14 Tage nach der Inokulation 100 %. Wenngleich sie durch Verwendung von Serumverdünnungen versuchten, die Antikör-

perbildung zu quantifizieren, sind sie der Auffassung, daß nur der Neutralisationstest eine sichere Aussage erlaubt.

2.3 ELISA beim Huhn

Die Untersuchung und Messung von Antigen-Antikörperreaktionen mit dem Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) wurde von 1971-1982 in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben.
Das Prinzip des ELISA beruht darauf, daß Proteine, z.B. Immun - globuline oder Antigene an bestimmte Polystyrole physikalisch gebunden werden. Durch immunologische Bindung dieser in soge - nannter Festphase vorliegenden Proteine mit entsprechenden An - tiseren, die ihrerseits mit Enzymen gekoppelt sind, können en - zymspezifische Reaktionen ausgelöst werden, die z.B. zu einer Farbreaktion führen, die qualitativ und/oder quantitativ photo - metrisch meßbar sind.
Die erste Beschreibung der ELISA-Methode wurde von ENGVALL und PERLMAN (1971) veröffentlicht. Später verwendeten sie van WEEMERS und SCHURRS (1971) bei der Labordiagnostik zur Anti - körperbestimmung in menschlichen und tierischen Seren. Die Me - thode ermöglicht Antikörper gegen parasitäre, bakterielle und virale Infektionen festzustellen. Nach der Angabe von ENGVALL und RUOSLATHI (1979) besitzt die ELISA-Methode die gleiche Sen - sitivität und Spezifität wie der Radioimmuno-Assay (RIA). De SAVIGNY u. VOLLER (1980) beschreiben den Einsatz der ELISA-Methode bei der qualitativen und semi-quantitativen Untersuchung von Anti - körpern. VOLLER et al. (1976) waren der Meinung, daß mit der ELISA-Methode nur die kleineren Molekule, z.B. Hormone, unter - sucht werden können. Außerdem behaupteten sie aus ihrer Erfah - rung, daß die ELISA-Methode nur dann erfolgreich durchgeführt werden kann, wenn bei der Untersuchung die einzelnen Schritte gut miteinander abgestimmt sind. Das Ergebnis des ELISA ist schwer zu interpretieren, da die Unterscheidung zwischen einem positiven bzw. negativen Serum schwierig ist. Diese Entscheidung wird besonders bei den Seren, die wenig Antikörper besitzen, sehr schwierig sein. De SAVIGNY und VOLLER (1980) schlugen vor, daß die Seren nur dann als positiv zu bewerten sind, wenn der

Extinktionswert größer als der Mittelwert einer umfangreicheren Gruppe von negativen Kontrollseren ist. Deshalb wird es als not - wendig erachtet, mindestens 10 Negativkontrollen mitzuuntersuchen. Um die ELISA-Interpretation weiter zu erleichtern, untersuchten GILMAN und DOCHERTY (1977), SLAGHT et al. (1979), MARQUARDT et al. (1980) Testseren parallel mit dem entsprechenden Antigen und einem negativen Kontrollantigen. Dabei legten sie fest, daß ein Serum nur dann als positiv bezeichnet wird, wenn der Unterschied der Extinktionswerte größer als 0,5 Extinktionseinheiten ist. DAWSEN et al. (1980) benutzten nur eine subjektive ELISA-Inter - pretation. Diese subjektive ELISA-Interpretation ist lediglich eine visuelle Bewertung des Farbumschlages.

Außer der unterschiedlichen ELISA-Interpretation gibt es bei die - ser Methode noch ein anderes Problem: Die Hintergrundfärbung. Die Ursache der Hintergrundfärbung wird von SAUNDERS (1979) wie folgt beschrieben:

Als Hauptursache ist eine unspezifische Bindung der Antikörper des Testserums an die ELISA-Platte, und zwar an die freigebliebenen Stellen nach der Antigen-Adsorption anzunehmen. Eine andere Ursa - che kann die unspezifische Bindung des Konjugats sein. SLAGHT et al. (1979) bezeichnet diese Hintergrundfärbung als eine ausgepräg - te Besonderheit für den ELISA mit Hühnerseren. Diese Art der un - spezifischen Bindung soll abhängig sein von der absoluten Menge der Immunglobuline, aber auch von Immunglobulin-Aggregaten im Testserum. GELLER et al. (1981) beschrieben die Ursache der Hin - tergrundfärbung als eine Folge von unspezifischer Konjugatbindung, die durch noch vorhandenes Glutaraldehyd im Konjugat nach unzu - reichender Dialyse verursacht werden soll. Um das Problem mit der Hintergrundfärbung zu beseitigen, wendeten SLAGHT et al. (1979) eine Modifikation der Antigen-Adsorption an, die eine unspezi - fische Bindung der Antikörper an der ELISA-Platte verhindert. Bei der Modifikation der Antigen-Adsorption wurde zuerst fötales Käl - berserum an die Platte mit nachfolgender Glutaraldehydfixierung (Precoating) adsorbiert, danach wird das Antigen durch Antrocknen auf der vorbeschichteten Platte fixiert. Mit dieser Methode wur - de die unspezifische Bindung der Antikörper an die ELISA-Platte verhindert.

Zur Beseitigung aller freigebliebenen Stellen der Testplatten empfiehlt SAUNDERS (1979) als zusätzlichen Schritt eine Behandlung der Platten mit Serum und Konjugatinkubationsmedium mit bovinem Serum-Albumin (BSA) oder Seruminkubationsmedium mit Salz. Beide Methoden sollen zu einer Verhinderung der Hintergrundfärbung beitragen.

Für die Anwendung bei der Diagnostik von Hühnerkrankheiten wurde das ELISA-Prinzip in zwei verschiedene Gruppen unterteilt. Zum Nachweis der Antikörper ist das ELISA-Prinzip in indirekter Form und in direkter Form zum Antigennachweis entwickelt worden.

2.3.1 Das ELISA-Prinzip zum Nachweis von Antikörpern

Dieses Prinzip ist bei der routinemäßigen Untersuchung sehr verbreitet.

2.3.1.1 Adsorptionsreaktion (Sensibilisierung, Beschichten, Coating).

Das Antigen wird an die Oberfläche einer Reaktionsplatte durch einfaches Inkubieren gebunden. Nach der Adsorption an die Mikrotiterplatte muß das Material fixiert werden. Die Adsorption wird durch Zeit, Temperatur und pH-Wert beeinflußt. Die Reaktion wird meist im alkalischen Milieu durchgeführt. Die Reagenzien werden in einem entsprechendem Coating-Puffer aufgenommen und in den Reaktionsplatten inkubiert. Sehr unterschiedlich sind die Inkubationszeiten und Temperaturen. Die optimale Menge der zu absorbierenden Reaktionspartner muß in einem Vorversuch ermittelt werden.

2.3.1.2 Antigen-Antikörper-Reaktion

Zu dem absorbierten Reaktionspartner wird die fragliche antikörperhaltige Flüssigkeit gegeben. Bei homologen Partnern kommt

es zu einer Antigen-Antikörperbindung, die jedoch nicht sichtbar ist.

2.3.1.3 Konjugat-Reaktion

Enzymmarkierte Reagenzien werden als Konjugat bezeichnet. Enzyme können chemisch an Protein gebunden werden, ohne daß die immunologische oder enzymatische Aktivität beeinträchtigt wird. Diese Bindung wird durch bi- oder multifunktionelle Reagenzien vermittelt. Der gebräuchliche Vermittler ist das Glutaraldehyd (AVRAMEAS 1969). Als Enzyme sind Peroxidase und alkalische Phosphatase am verbreitesten. Ein enzymgebundenes Antiserum gegen die Spezies, deren Serum untersucht wird, wird zugesetzt. Es kann nun zur Bindung kommen, wenn in Phase 2 eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat.

2.3.1.4 Substratreaktion

Substrate sind Reagenzien, die durch die Einwirkung von Enzymen zu farbigen Lösungen umgesetzt werden. Je mehr Konjugat gebunden wurde, umso stärker fällt der Farbumschlag in der Substratreaktion aus. Bei Verwendung der alkalischen Phosphatase wird als Substrat 4-Nitrophenylphosphat verwendet. Es wird umgesetzt zu dem gelben p-Nitrophenolat, das im Spektralphotometer bei 405 nm gemessen werden kann. Bei Verwendung von Peroxidase wird als Substrat 5-Amino-Salizylsäure verwendet. Es wird zu einem braunem Reaktionsprodukt umgesetzt, das bei 490 nm gemessen werden kann.

2.3.1.5 Reaktionsabbruch

Die in Phase 4 erzeugte Farbreaktion wird nach einer bestimmten Zeit abgebrochen, um zu vergleichbaren Werten zu gelangen.

2.3.1.6 Messen der Farbintensität im Photometer

2.3.1.7 Waschen

Im Festphasen-Enzymtest werden nicht gebundene Reaktionspartner von gebundenen durch Waschen getrennt. Die Sorgfalt beim Waschvorgang beeinflußt die Reaktion erheblich, zwischen jedem Reaktionsschritt wird mit einem Überschuß an Waschflüssigkeit die Reaktionsplatte 3-5 mal gewaschen. Vor dem Auftragen eines weiteren Reagenz werden die Platten so weit wie möglich geleert.

2.4 Anwendung des ELISA bei verschiedenen Krankheitserregern

SLAGHT et al. (1978) verwendeten die ELISA-Methode zum ersten Mal bei der Untersuchung der Antikörper in Hühnerseren gegen verschiedene Reoviren, wobei die Antigene mit den Stämmen S 1133, UM 203, Reo 25 (WINTERFIELD) in embryonalen Fibroblasten hergestellt wurden. Die Antiseren wurden von SPF-Hühnern, die mit Freund's inkompletten Adjuvans und den entsprechenden Antigenen inokuliert waren, gewonnen. Das verwendete Konjugat ist ein Kaninchen-Antiserum, das gegen Hühnerimmunoglobulin (Ig) gerichtet ist und mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Bei der Untersuchung der Antikörper im Serum wendeten sie die ELISA-Methode nach SAUNDERS und CLINARD (1976) an. Die Ergebnisse der ELISA-Methode wurden mit denen der AGP (CROWLE 1973) verglichen. Zur Verminderung der unspezifischen Reaktion im ELISA wurden die Platten zuerst mit 0,05 ml 2,5 %igen fötalem Kälberserum beschichtet und getrocknet. Danach mit 0,5 ml von 2 %iger Glutaraldehyde-Lösung in PBS (pH 7,4) fixiert. Nach 30 min. (Reaktionszeit) wurde die Platte 4 mal gewaschen und mit Antigen beschickt. Nach der Untersuchung wurde festgestellt, daß die Sensibilität bei der ELISA-Methode sehr viel höher als bei der AGP ist.
Die mit der ELISA-Methode untersuchten Antireovirus-Seren sind bis zu einer Verdünnung von 1:18 000, die Anti-UMI-203 und Anti-WINTERFIELD-Reovirus-Seren bis zu einer Verdünnung von 1:4056 positiv. Die Untersuchungen wurden vergleichend in der AGP durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß in gleichen Verdünnungsverhältnissen wie vorher keine Reaktion auftrat. Außerdem wurde

der Endpunkt von Anti - S-1133 Reovirus-Serum bis zu einer Ver - dünnung von 1:13 689 in dem ELISA als positiv erhalten. Bei der AGP-Methode wurden nur schwache Reaktionen festgestellt.

THOEN et al. (1978) verwendeten den ELISA zur Untersuchung von Antikörpern gegen Mycobacterien. Dazu wurde Mycobacterium avium purified protein derivative tuberculin (PPD) von Kulturfiltrat vom Mycobacterium avium-Stamm D-4 der Tuberkulose benutzt. Die verwendeten Seren bei der Untersuchung des Antikörpers wurden von mit M. avium Serotyp 2 intramuskulär infizierten Hühnern entnommen. Als Konjugat wurde Rabbit-antichicken-gammaglobuline mit Meerrettichperoxidase gekoppelt nach der Methode von NAKANE und KAWAOI (1974). Außerdem wurde die unspezifisch positive Re - aktion nach der Methode von SLAGHT (1979) vermindert. Die Anti - körperbestimmung wurde nach der ELISA - Methode von SAUNDERS und CLINARD (1976) durchgeführt. Es ergab sich, daß dieser ELISA eine genügend hohe Sensibilität hat, um Antikörper bei mit M. avi - um-Serotyp 2 - infizierten Hühnern 2 Wochen nach Infektion fest - zustellen. Der ELISA ist danach eine schnelle Untersuchungsme - thode, die praktikabel ist und zur Feststellung von natürlich in - fizierten Hühnern eingesetzt werden kann.

MARQUARDT et al. (1980) benutzten einen ELISA zur Untersuchung auf Antikörper gegen Infektiöse Bursitis (IBD) - Virus. Das ver - wendete Antigen wurde in primären Küken-Embryo-Nierenzellkultu - ren hergestellt und danach gereinigt. Das Testserum wurde von 8-wöchigen SPF-Hühnern, die mit 10^3 - Verdünnung einer IBD - Vaccine intraoculär infiziert worden waren, 4 Tage nach der In - okulation entnommen. Mit Meerrettichperoxidase gekoppeltes An - ti-Huhn-IgG wurde nach der Methode LEINIKKI et al. (1978) her - gestellt. Bei dieser Untersuchung wurde der verwendete ELISA nach VOLLER et al. (1976) und MATHIESEN et al. (1978) durchge - führt. Dazu wurde die erste horizontale Reihe der Mikrotiterplat - te mit 0,2 ml einer 1:200-Verdünnung des IBD-Virus beschichtet. Die Antigene zur Beschichtung wurden vorher mit 0,05 M Carbonate/ Bicarbonate Coating Puffer (pH 9,6) suspendiert. Die zweite ho - rizontale Reihe der Mikrotiterplatte wurde mit negativem Kontroll -

Antigen beschickt. Die Mikrotiterplatte wurde bei 4°C in der feuchten Kammer über Nacht inkubiert, dann ausgeschüttet und 3 mal gewaschen. Die Mikrotiterplatten wurden bei -70°C in Plastikbehältern aufbewahrt. Bei der Verwendung wurde zuerst die Mikroplatte auf Zimmertemperatur gebracht. Bei der Untersuchung der Antikörper im Serum von Hühnern gegen IBD-Virus wurde das Ergebnis mit der AGP-Methode (CHUBB und CHURCHILL 1968) und der SN-Methode (WEISMAN und HITCHNER 1978) verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, daß der ELISA bei der Untersuchung von IBD-Antikörpern im Serum der Hühner eine Sensibilität hatte, die 20-2500 mal größer ist als die der AGP-Methode und auch empfindlicher als die SN ist. Außerdem wurde keine unspezifische Reaktion bei einem höheren Serumverdünnungsverhältnis als 1:10 bzw. 1:50 festgestellt. Deshalb sind die Autoren der Meinung, daß wegen der hohen Sensitivität der ELISA-Methode die niedrigen Serumverdünnungen nicht berücksichtigt zu werden brauchen. Zur Verminderung der unspezifischen Reaktionen empfahlen sie, daß die verwendeten Antigene gereinigt werden sollten und bei der Untersuchung eine negative Antigenkontrolle parallel durchgeführt werden muß. Sie heben hervor, daß die ELISA-Methode viele Vorteile besitzt, z.B. Sensitivität und Spezifität, Sicherheit, Bewertung durch Farbänderung, kurze Dauer der Durchführung, d.h. nur 3 Stunden, wenn die Platte vorher mit Antigen beschichtet worden ist.

SOULA und MOREAU (1981) versuchten geeignete Antigene aus Infektiöse Bronchitis Virus (IBV) zur Untersuchung von Antikörpern in Hühnerseren für die ELISA-Methode herzustellen. Als Produktionsstamm wurde der Massachussetts-Stamm des IBV in der Chorioallantois-Höhle von 9-Tage embryonierten SPF-Eiern vermehrt. Die gewonnene Allantois-Flüssigkeit wurde auf dem Saccharose-Gradienten gereinigt. Das gewonnene Antigen wurde mit Bromelain (Sigma) nach der Methode COMPANS et al. (1970) und mit Phospholipase E Typ 1 nach der Methode von ALEXANDER und CHETTLE (1977) behandelt. Als Testseren wurden Hühnerseren von 3-Monate-alten SPF-Hühnern, die mit 10^6-EID_{50}-IBV inokuliert worden waren, 1 Monat nach der Infektion gewonnen und

danach bei 36°C für 30 min. inaktiviert und bei 4°C aufbewahrt. Die ELISA-Methode wurde nach AMBROISE-THOMAS und DESGEORGE (1978) durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse ihrer Untersuchung kamen sie zu folgenden Aussagen:

Die mit dem Saccharose-Gradienten gereinigten IBV-Antigene haben eine höhere Sensitivität. Um eine optimale Sensitivität zu bekommen, mußte das gereinigte Antigen 10 µg/ml Protein enthalten. Das mit Bromelain behandelte IBV und das mit Lipase behandelte IBV sowie das Kontroll-IBV haben bei der Untersuchung im ELISA gleiche Ergebnisse. Die Verwendung der gereinigten Antigene und der Zusatz von 1 % BSA führen zu einer Verminderung der unspezifischen Reaktion, die eine Ursache für die Hintergrundfärbung ist. Der ELISA könnte zur Untersuchung des Antikörpers in Seren bei natürlichen Infektionen und nach Vaccination von Hühnern eingesetzt werden.
GARCIA und BANKOWSKI (1981) verglichen die Antikörperbildung gegen IBV vom Typ Massachussetts 41 und CONNECTICUT 46 in der ELISA-Methode und dem SN in Kükenembryonierenzellkultur. Als Antigene verwendeten sie infektiöse Allantois-Flüssigkeit, die durch Zentrifugation teilgereinigt war. Die Testseren stammten von einer kommerziellen Legeherde, die gegen Massachussetts- bzw. Connecticutstämme durch Trinkwasservaccination geschützt war. Die Autoren stellten fest, daß der ELISA zur Untersuchung auf Antikörper gegen IBV folgende Vorteile hat:

Testserum kann in kleiner Menge bei der Untersuchung verwendet werden, viele Seren können in kurzer Zeit untersucht werden, geeignet zur Untersuchung natürlicher Antikörper gegen IBV in einwöchigen Küken, obwohl bei der Untersuchung im SN festgestellt wurde, daß der Antikörper-Titer sehr niedrig oder undeutlich ist.

MOCKETT und DARBYSHIRE (1981) untersuchten Hühnerseren auf Antikörper gegen IBV-Stamm Massachussetts 41 zwischen dem 3. bis 4. Tag und dem 63. Tag nach der Impfung mit folgenden Untersuchungsmethoden: ELISA, Haemagglutinations-Hemmungstest

(HAH) und SN. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß der ELISA für die angewandte Fragestellung verwendet werden kann und seine Sensi - tivität höher ist als die SN oder der HAH-Test. Die ELISA-Me - thode kann schon 4 Tage nach der Impfung zum Nachweis von Anti - körpern verwendet werden.

MEULEMANS und HALEN (1982) wenden die ELISA-Methode zum Nach - weis von Antikörpern gegen Infektiöse Laryngotracheitis (ILT) der Hühner an. Das Antigen dazu wurde in Hühnerembryoleberzell - kulturen hergestellt. Die Hühnerseren wurden von 6- bis 25-wöchi - gen SPF-Hühnern entnommen, die intratracheal infiziert worden waren. 5 Wochen nach der Impfung wurde das Blut entnommen. Die Autoren stellten fest, daß die ELISA-Methode auch zum Nachweis von Antikörpern gegen das ILT-Virus geeignet ist. Bei der Ver - suchsdurchführung stellten sie fest, daß die Adsorption zwischen IgM und Polystyrol zu unspezifischen Reaktionen führen kann. Die Adsorption hängt von dem Alter der verwendeten Hühner und der Men - ge des IgM im Serum und der Art der Beschichtung des Antigens auf die Mikrotiterplatte ab. Zur Verhinderung der unspezifischen Reaktion wurde die Methode von SLAGHT (1979) angewandt oder bei der Beschichtung der Antigene auf die Mikrotiterplatte Bicar - bonatpuffer anstelle von PBS verwendet. Trotz aller Maßnahmen zur Verminderung der unspezifischen Reaktion wurde festgestellt, daß auch negatives Serum an Antigen adsorbiert werden kann.

2.5 Direkter Antigennachweis mit der ELISA-Methode

IGNJATOVIC und BAGUST (1982) wendeten bei der Untersuchung des aviären Leukosevirus einen direkten ELISA an. Dabei wurde die Sensitivität der ELISA-Methode mit der des Phenotypic-Mixing-Tests verglichen. Das Untersuchungsmaterial wurde durch Vaginal - abstrich bei Legehühnern im Alter von 26-50 Wochen von verschie - denen Herden gewonnen. Die Herden wurden so gewählt, daß ent - weder Tumoren bei Hennen der Herde festgestellt worden waren bzw. die Kontrollherden eine sehr hohe Legeleistung aufwiesen. Außer den Abstrichen wurde Albumin von Eiern und Embryoextrakt von Hühnern, die mit LLV infiziert worden waren, als Material ver -

wendet. Bei dieser Methode wurde nach der kompetitiven Sand - wichtechnik von BELANGER et al. (1973) und VOLLER et al. (1976) zur Kopplung zwischen IgG und Meerrettichperoxydase verfahren und entweder Glutaraldehyd als Vermittler (AVRAMEAS et al. 1978) oder Perjodat (WILSON und NAKANE 1978) benutzt. Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurde 0,5 % BSA dem Konjugatmedium zugesetzt. Der Phenotypic-Mixing-Test wurde nach der Methode von OKAZAKI et al. (1975) und die KBR nach SARMA et al. (1964) durchgeführt. Die Untersucher kamen zu dem Ergebnis, daß Perjo - dat als Vermittler für die Kopplung zwischen IgG und Meerrettich - peroxydase besser geeignet ist als Glutaraldehyd. Die unspezi - fischen Reaktionen waren in diesem System geringer, eine Beob - achtung, die auch von SMITH et al. (1979) und FADLY et al. (1981) bestätigt wurde.

CHUC-HO-DINH et al. (1982) erwähnen eine ELISA-Methode zur Be - stimmung von Antikörpern gegen AEV, die wesentlich empfindli - cher sein soll als die von ULLOA (1980) beschriebene AGP. Eine Beschreibung der Methode wird nicht gegeben.

3. Material und Methode

3.1 Antigen

3.1.1 Virusstamm

Laboreigener AEV-Stamm van ROEKEL, in Hühnereikulturen vermehrt.

3.1.2 Virusvermehrung und Titration

0,2 ml AEV-Suspension wurden 5-tätig embryonierten Hühnereiern über den Dottersack inokuliert. Je log 10 Verdünnungsstufe wurden 5 Eier beimpft. Embryonen, die innerhalb 24 h abstarben, wurden als unspezifisch verworfen. Nach einer Inkubationszeit von 12 Tagen wurden die Embryonen gewonnen. Das Gehirnmaterial derjenigen Embryonen, die typische Erscheinungen der AE zeigten, wurde geerntet, gepoolt und titriert. Der Titer, angegeben in EID_{50}/ml, errechnete sich nach der Methode von REED und MUENCH (1938).

3.1.3 Antigenherstellung

3.1.3.1 Herstellung des AEV-Antigens

5-tätig embryonierte Hühnereier wurden mit je 1000 EID_{50} AEV Antigen inokuliert. Das Inokulum enthielt ferner 100 IE-Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml. Nach einer Bebrütungszeit von weiteren 7 Tagen wurden die Embryonen durch Kälte abgetötet und das Hirnmaterial geerntet. Das Gehirnmaterial wurde mit der gleichen Menge einer gepufferten Salzlösung nach EARLE mit 0,5 % Lactalbuminhydrolysat homogenisiert und anschließend bei 2000 x g 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde als AEV-Virussuspension gewonnen.

3.1.3.2 Herstellung des Kontroll-Antigens

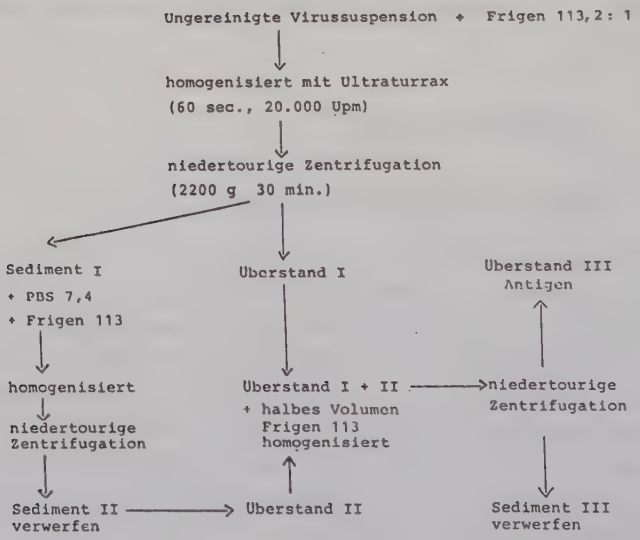
Das Kontroll-Antigen wurde analog hergestellt. Hierzu diente das Gehirnmaterial von Embryonen, die entsprechend mit PBS in den Dottersack inokuliert waren.

3.1.3.4 Reinigung und Konzentrierung der Antigene

Die Antigene wurden nach der Methode von MAYR et al. (1977) gereinigt und konzentriert. Als Ausgangsmaterial dienten die unter 3.1.3.1 und 3.1.3.2 beschriebenen Überstände, die mit Fluorocarbon (Frigen 113, 2:1) gemischt wurden.

Die weitere Behandlung erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 1 Arbeitsablauf der Antigenreinigung



Eine weitere Konzentration auf ein Zehntel der Ausgangsmenge erfolgte durch Dialyse gegen Polyäthylenglykol MG 20000. Das so gewonnene, gereinigte Antigenkonzentrat wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.2. Seren

3.2.1 AEV-antikörperhaltige und -verdächtige Seren

Seren standen von mehreren kommerziellen Elterntierherden im Alter von 12, 18, 22, 30, 38, 46 und 54 zur Verfügung. Die Hennen waren in der 14. und 15. Woche gegen AEV mit kommerzieller Lebendvaccine immunisiert worden.

3.2.2 Antikörperfreie Seren

Als Kontrollserum wurde Serumpool von 3 Tieren der instituts-eigenen SPF-Herde verwendet, die frei von Antikörpern gegen AEV war.

3.2.3 Serum - Reinigung

Bevor die Seren untersucht wurden, wurden sie nach der Methode von MAYR et al. (1977) gereinigt und konserviert. Hierzu wurden zu einem Teil Chloroform 2 Teile Serum gegeben. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur 30 min. lang geschüttelt und anschließend bei 1500 g 15 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden gewonnen und bis zu ihrem Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Dotter

3.3.1 AEV-antikörperhaltige Dotter

Zur Untersuchung des Immunstatus mehrerer kommerzieller Elterntierherden kamen 6-tägig bebrütete Eier der 22., 30., 38., 46. und 54. Woche zur Untersuchung. Die Legeherden

waren im Alter von 14 und 15 Wochen gegen AEV immunisiert worden. Jedem Ei wurde 0,2 ml Dottermaterial entzogen und mit der gleichen Menge einer physiologischen Kochsalzlösung suspendiert. Diese Suspension wurde mit der gleichen Menge Chloroform ausgeschütteltund anschließend 15 min. bei 1000 g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde mit der ELISA-Methode auf AEV-Antikörper hin untersucht. Zum Vergleich wurden die gleichen Eier im EET geprüft.

3.3.2 Antikörperfreie Dotter

Gleich behandeltes Dottermaterial von 6-tägig embryonierten Hühnereiern der institutseigenen SPF-Herde dienten als negative Kontrolle.

3.4 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

3.4.1 Herstellung der verwendeten Lösungen

3.4.1.1 Antigen-Adsorptionsmedium (Coating puffer)

Der Coating-Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
NaN_3	0,2 g
Aqua dest. ad	1000

3.4.1.2 Waschlösung (PBS/Tween pH 7,4)

Als Waschmedium diente eine Lösung mit folgender Zusammensetzung:

NaCl	8,0 g
KH_2PO_4	0,2 g
$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	2,9 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
Aqua dest. ad	1000

3.4.1.3 Serum und Konjugat-Inkubationsmedium

Serum- und Konjugatverdünnungen wurden mit Waschlösung (PBS/ Tween pH 7,4) durchgeführt, dem 1 % bovines Serum-Albumin, Fraction V (Fa. Serva, Best.Nr. 11 930) zugeführt war.

3.4.2 Konjugat

Als Konjugat diente das mit Meerrettich-Peroxydase gekoppelte Kaninchen-Antihuhn-Immunglobulin G (H + L-Ketten der Fa. Nordic Nr. 15682). Dieses lyophilisierte Konjugat wurde mit Aqua dest. 1:10 zu einer Stammlösung aufgelöst und bei 4°C dunkel gelagert. Vor Verwendung wurde die Stammlösung mit dem Konjugat-Inkubationsmedium auf eine Endverdünnung von 1:400 gebracht.

3.4.3 Substrat

Zur Substratherstellung wurden 80 mg 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure Merck Nr. 820095 in 100 ml warmen Aqua dest. aufgelöst. Diese Lösung wurde bei 4°C dunkel aufbewahrt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde die Lösung wiederum auf Zimmertemperatur erwärmt und mit 1 M NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Vor Verwendung des Substrats wurde dieser Lösung eine 0,1%ige H_2O_2 - Lösung im Verhältnis 1:10 beigemischt.

3.4.4 Photometrische Messung

Die Auswertung der Substrat-Enzym-Reaktion erfolgte mit dem Biotek EIA Reader, Modell Nr. EL 307 IE, bei einer Wellenlänge von 490 nm.

3.4.5 ELISA-Platten

Es wurde die ELISA-Flachbodenplatte Nr. M 129 B der Fa. Dynatech verwendet.

3.4.6 Durchführung des ELISA

Der ELISA wurde nach der von MARQUARDT et al. (1980) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Mikro-ELISA-Platten wurden je Kavität mit 0,2 ml AE-Antigen, das 1:10 mit Coating-Puffer verdünnt war, beschichtet. Jede 2. Reihe der ELISA-Platte wurde auf gleiche Weise mit dem Kontrollantigen beschichtet. Anschließend wurde die Platte mit einem nassen Löschpapier bedeckt und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert. Der Überstand wurde daraufhin abgeschüttet und die Platte 3 x für 2 min. mit Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die mit Serum-Medium in $\log_{10}$ Stufen verdünnten Seren in einer Menge von 0,2 ml jeweils in eine Kavität mit positivem bzw. negativem Antigen getropft. Es folgte eine 2-stündige Inkubationszeit bei 37°C. Nach der Inkubationszeit wurden die ELISA-Platten wiederum 3 x gewaschen und anschließend mit 0,2 ml des 1:400 verdünnten Konjugats beschickt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für zwei Stunden. Hiernach schloß sich wiederum ein einmaliger Waschvorgang an.

Es folgte die Zugabe der Substratlösung in einer Menge von 0,2 ml pro Kavität und eine anschließende 30-minütige Inkubationszeit bei Zimmertemperatur und Dunkelheit. Nach exakt 30 min. wurden zu jeder Probe 0,05 ml 3 M NaOH zugesetzt, um die enzymatische Reaktion zu beenden. Die Ergebnisse wurden hiernach photometrisch abgelesen.

Der Arbeitsablauf ist in Tabelle 2 schematisch dargestellt.

Tabelle 2 Arbeitsablauf des ELISA

Material	Medium	Verdünnung	Volumen	Zeit	Temperatur
pos.AE-Antigen neg.AE-Antigen	Carbonatpuffer pH 9,6	1 : 10 1 : 10	0,2 ml 0,2 ml	Über Nacht	Zimmertempe - ratur
		3 mal waschen			
Seren	PBS/Tween pH 7,4 + 1 % BSA	1 : 10 1 : 100 1 : 1000 1 : 10000	0,2 ml	2 Std.	37°C
		3 mal waschen			
Konjugat	PBS/Tween pH 7,4 + 1 % BSA	1 : 400	0,2 ml	2 Std.	37°C
		3 mal waschen			
Substrat			0,2 ml	30 min.	Zimmertempe - ratur
Reaktions-abbruch	NaOH		0,05 ml		

Extinktionsmessung

3.4.7 Kontrollen

In jeder ELISA-Platte wurden außer dem Kontrollantigen folgende Kontrollen mitgeführt.

1) Positive Serumkontrolle
2) Negative Serumkontrolle
3) Serumfreie Kontrolle
4) Antigenfreie Kontrolle
5) Serum- und -antigenfreie Kontrolle

3.4.8 Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden nach der Methode von MARQUARDT et al. (1980) ausgewertet. Hierzu wird der Wert der optischen Dichte (OD), der mit dem Kontrollantigen erhalten wird, vom Wert der OD, der mit dem AEV-Antigen erhalten wird, abgezogen. Ist die Differenz $> 0{,}2$, so gilt das Ergebnis als positiv. Die höchste Serumverdünnung, die noch positiv ist, wird als Endpunkt bezeichnet.

3.5 Weitere Methoden zum Antikörpernachweis

3.5.1 Embryoempfänglichkeitstest

Zur Untersuchung des Immunstatus der Legehennen gegen das AEV wurden Eier von Hennen im Alter von 22, 30, 38, 46 und 54 Wochen verwendet. Die 6-tägig embryonierten Hühnereier werden mit 100 EID_{50} AEV via Dottersack beimpft. Am 12. Tag nach der Verimpfung werden die Eier geöffnet, um spezifische Veränderungen zu bewerten. Zeigen alle Embryonen typische Veränderungen durch AEV, wird angenommen, daß die Herde AE empfänglich ist. Zeigen mehr als 70 % der Embryonen keine charakteristischen Veränderungen, so gilt die Herde als immun. Je eine AEV positive und negative Kontrolle wurden mitgeführt.

3.5.2 Agar-Gel-Präzipitationstest (AGP)

Die Seren der Legehennen im Alter von 12, 18, 22, 30, 38, 46 und

54 Wochen wurden auch in der AGP untersucht. Das Gel bestand aus 1,2 %igem Oxoidagar, gereinigt (Oxoid-Nr. L 28) in 15%iger NaCl-Lösung mit einem Zusatz von 0,5 % Natriumazid. Der autoklavierte Agar wurde in einer Menge von 20 ml in Plastikpetrischalen, Ø 9 cm, eingefüllt. Der Durchmesser der Stanzlöcher betrug 3,5 mm, der Abstand der Stanzlöcher 3 mm. Nach dem Einfüllen der Reaktionskomponenten wurden die Petrischalen bei Zimmertemperatur inkubiert und das Ergebnis täglich über 1 Woche abgelesen.

3.5.3 Virus-Neutralisation

Die SN wurde mit der ß-Methode mit 100 EID_{50}/0,1 ml und log_2 verdünnten, gepoolten Seren (Gesamtpool je Untersuchungszeitpunkt) durchgeführt. Jeweils gleiche Mengen Serumverdünnung und AEV-Testvirus wurden für 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Je 0,2 ml dieses Gemisches wurde embryonierten Hühnereiern via Dottersack injiziert. Je Verdünnungsstufe wurden 5 Eier verwendet. Am 12. Tag nach der Inokulation wurden die Eier geöffnet und die Embryonen auf charakteristische Veränderungen hin untersucht. Die entsprechenden Titer wurden nach REED und MUENCH (1938) berechnet.

4. Versuchsergebnisse

4.1 Schachbrett-Titration zur Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration

Um die optimale AEV-Antigenmenge zu bestimmen, wurde das Verfahren nach VOLLER et al. (1977) verwendet. Hierzu wurde die AEV-Stammlösung mit Carbonat-Puffer im Verhältnis 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 verdünnt und in einer Menge von 0,2 ml auf die ELISA-Platte aufgebracht. Ein ebenso verdünntes negatives Kontrollantigen wurde in der gleichen Menge mitgeführt. Die so beschickte ELISA-Platte wurde mit einem befeuchteten Vlies bedeckt und bei Zimmertemperatur über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgeschüttet und nach drei Waschvorgängen zu jeder Antigenverdünnung jeweils ein positives und ein negatives Serum in einer PBS/Tween-Verdünnung von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 getropft. Als Leerwert dienten Kavitäten, die nur mit PBS/Tween beschickt wurden. Für jede Serumverdünnung wurde die Differenz der OD, die mit positiven-bzw. Kontroll-Antigenen erhalten wurden, errechnet. Auf der Grundlage der so korrigierten Ergebnisse des Schachbrettverfahrens wurde die optimale AEV-Antigenkonzentration bei einer Verdünnung von 1:10 des teilgereinigten und konzentrierten AEV-Antigens bestimmt (3.1.3.4). (Tab. 3)

Tabelle 3: Schachbrett-Titration zur Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration

Antigen	Antigen verdünnung	Verdünnung d.pos.Seren 10^1	10^2	10^3	10^4	Verdünnung d.neg.Seren 10^1	10^2	10^3	10^4	Leerwert PBS/Tween
pos. AE Antigen	1 : 10	1,206 *	1,002	0,736	0,513	0,302	0,29	0,16	0,12	0,07
	1 : 20	0,864	0,700	0,574	0,426	0,28	0,21	0,14	0,09	0,06
	1 : 40	0,621	0,600	0,476	0,392	0,27	0,26	0,16	0,06	0,01
	1 : 80	0,569	0,426	0,396	0,351	0,21	0,18	0,09	0,10	0
neg. AE Antigen	1 : 10	0,304	0,296	0,275	0,246	0,26	0,25	0,17	0,07	0,05
	1 : 20	0,300	0,278	0,256	0,227	0,24	0,21	0,15	0,04	0,04
	1 : 40	0,246	0,237	0,228	0,201	0,26	0,20	0,15	0	0,01
	1 : 80	0,221	0,209	0,201	0,200	0,20	0,20	0,10	0	0
korri - gierte Ergebnis- se	1 : 10	0,902	0,706	0,561	0,267	0,042	0,04	0	0	0
	1 : 20	0,564	0,322	0,318	0,199	0,04	0	0	0	0
	1 : 40	0,375	0,203	0,248	0,15	0,01	0	0	0	0
	1 : 80	0,348	0,217	0,195	0,141	0,01	0	0	0	0

* OD

4.2 Haltbarkeit und Lagerfähigkeit der mit AEV-Antigen beschichteten ELISA-Platten

Die mit 1:10 verdünntem AEV-Antigen beschichteten ELISA-Platten wurden in Plastikfolien luftarm versiegelt und im Kühlschrank bei 4°C bzw. im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Aktivität der beschichteten ELISA-Platten wurde wöchentlich mit positiven und negativen Seren untersucht. Reproduzierbare Ergebnisse wurden bei der im Kühlschrank aufbewahrten Probe bis 4 Wochen festgestellt. Die bei -20°C gelagerten Platten erwiesen sich bis zu 5 Wochen haltbar.

4.3 Vergleichende Untersuchung über den Verlauf der Antikörper nach Immunisierung gegen AEV mittels ELISA, AGP und SN

Die Ausbildung und der Verlauf der Antikörper nach einer Impfung mit AE wurde in 3 Legeherden untersucht. Die Seren kamen in der 12., 15., 18., 22., 30., 38., 46. und 54. Woche zur Untersuchung. Die AE-Impfung wurde in der 14. oder in der 15. Lebenswoche durchgeführt.

Farm A

Vergleichende serologische Untersuchungen auf präzipitierende und ELISA-positive AEV-Antikörper gibt die Tabelle 4 sowie die Abb. 1 wieder. Vor der AE-Impfung in der 15. Woche waren keine präzipitierenden Antikörper nachweisbar. 12 von 28 untersuchten Seren waren im ELISA positiv. Ein deutlicher Anstieg der im ELISA nachweisbaren Antikörper ist schon 3 Wochen nach der AE-Impfung feststellbar. Die höchsten Antikörpertiter werden in der 7. postvakzinalen Woche bei einem Mittelwert der reziproken Serumverdünnung von 3415 festgestellt. Danach fallen die ELISA - Antikörper langsam ab. Präzipitierende Antikörper waren ebenfalls erstmals 3 Wochen nach der Impfung feststellbar. Die höchste Nachweisrate der präzipitierenden AEV-Antikörper wurde in der 23. postvaccinalen Woche mit 23,3 % erreicht.

Tabelle 4: Vergleich der AEV-Antikörperbildung in Farm A

Alter in Wochen	Anzahl der Seren	ELISA-Titer neg.	10^a	100	1000	10000	GMT	AGP pos.	% pos.AGP
12	28	19	4	4	1	-	3	-	-
15	AE-Impfung								
18	30	-	3	5	8	14	1259	1	3,3
22	15 Pool-Seren je 5 Seren	-	-	2	3	10	3415	1	6,6
30	15 Pool-Seren je 5 Seren	-	-	2	3	10	2928	2	13,3
38	30	-	-	2	12	16	2928	7	23,3
46	24	-	-	1	8	15	2831	5	20,8
54	29	-	2	3	7	17	2212	3	10,3

a = reziproker Wert der Serumverdünnung
GMT = geometrischer mittlerer Titer

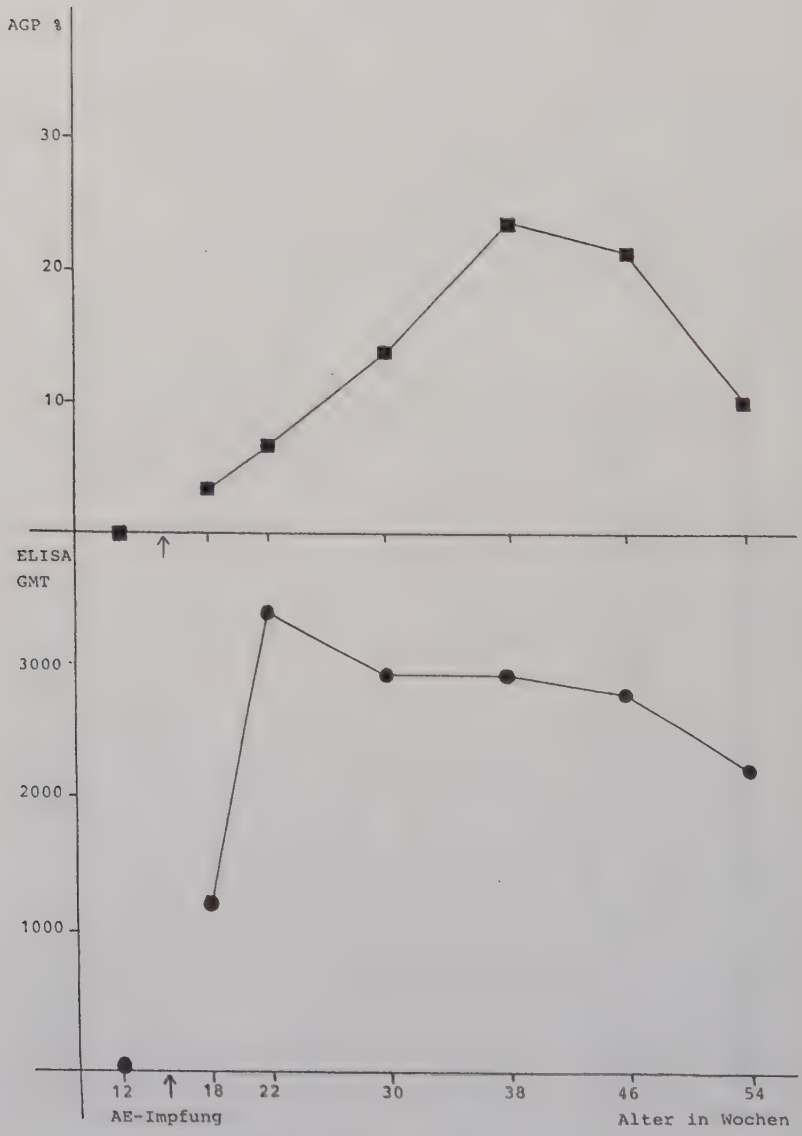


Abb.1: Verlauf der AEV-Antikörper in Farm A.

Farm B

Vergleichende serologische Untersuchungen auf präzipitierende und ELISA-positive AEV-Antikörper der Legeherde der Farm B gibt die Tabelle 5 sowie die Abb. 2 wieder. Vor der AE-Impfung in der 14. Lebenswoche konnten hier keine präzipitierenden Antikörper nachgewiesen werden, auch lag der Mittelwert der reziproken Serum - verdünnung mit 2 sehr niedrig. 4 Wochen nach der durchgeführten Impfung waren 100 % der Seren im ELISA positiv bei einer mittleren reziproken Serumverdünnung von 794. Die im ELISA nachweisbaren An - tikörper erreichten in der 16. postvakzinalen Woche ihre höchsten Werte. Präzipitierende Antikörper waren erstmals in der 8. post - vaccinalen Woche nachweisbar und erreichten die höchste Rate der Nachweisbarkeit mit 26,6 % in der 24. Woche nach der Impfung.

Tabelle 5: Vergleich der AEV-Antikörperbildung in Farm B

Alter in Wochen	Anzahl der Seren	ELISA - Titer					GMT	AGP pos.	% pos.AGP
		neg	10[a]	100	1000	10000			
12	30	21	8	1	-	-	2	-	-
14	AE - Impfung								
18	10 Pool-Seren je 5 Seren	-	1	3	2	4	794	-	-
22	8 Pool-Seren je 5 Seren	-	-	2	2	4	1778	1	12,5
30	30	-	-	2	12	16	2928	6	20
38	30	-	-	2	14	14	2512	8	26,6
46	30	-	-	2	14	14	2512	7	23,3
54	30	-	-	1	15	14	2712	4	13,3

a = reziproker Wert der Serumverdünnung
GMT = geometrischer mittlerer Titer

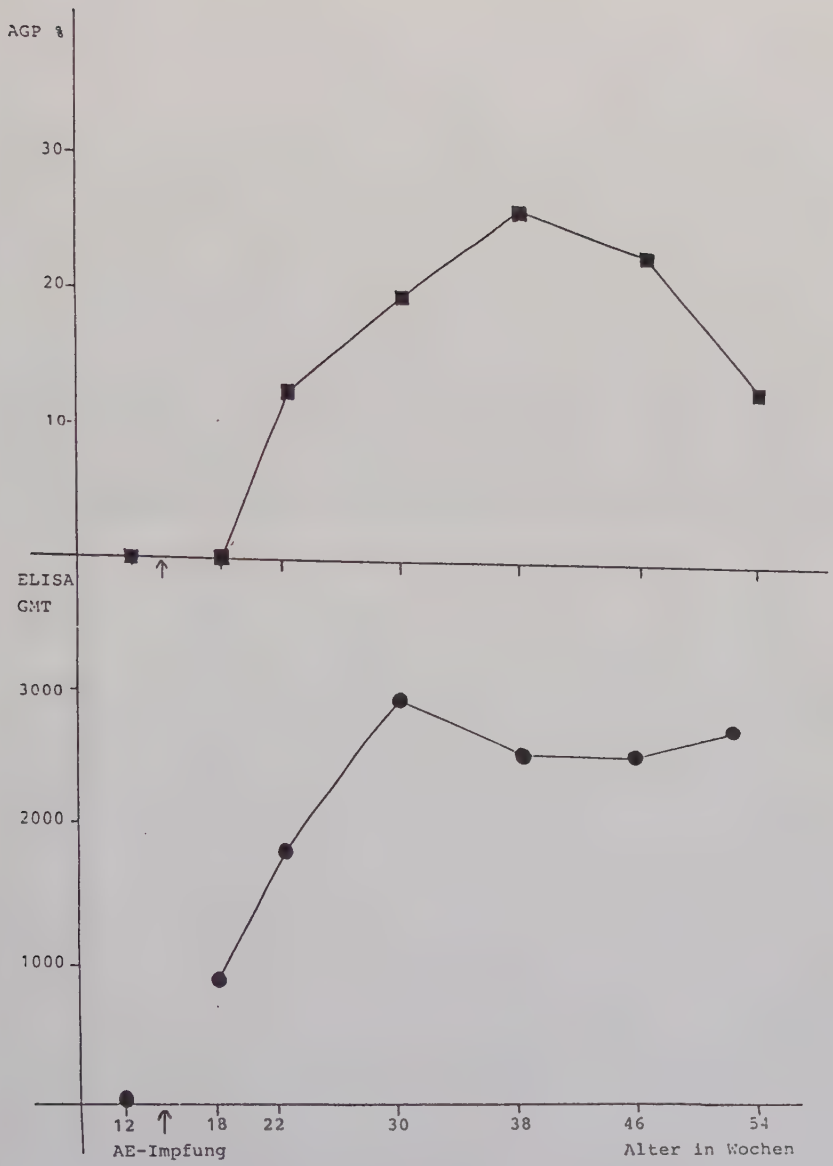


Abb. 2: Verlauf der AEV-Antikörper in Farm B.

Farm C

Die vergleichende serologische Untersuchung auf präzipitierende und ELISA-positive AEV-Antikörper in der Legeherde der Farm C gibt die Tab. 6 sowie die Abb. 3 wieder. Vor der Vakzination in der 14. Lebenswoche waren präzipitierende Antikörper nicht nachweisbar. 5 von 29 untersuchten Seren waren ELISA-positiv, jedoch erreichte der Mittelwert der reziproken Serumverdünnung nur einen Wert von 3. Vier Wochen nach der AE-Impfung reagierten 100 % der Seren im ELISA positiv und erreichten 8 Wochen danach bei einem Mittelwert für die reziproke Serumverdünnung von 5623 ihre höchsten Titer. Präzipitierende Antikörper waren in dieser Herde zum ersten Mal 8 Wochen nach der Impfung nachweisbar. Die höchste Nachweisbarkeit mit 30 % konnte in der 32. postvakzinalen Woche festgestellt wer - den.

Tabelle 6: Vergleich der AEV-Antikörperbestimmung in Farm C

Alter in Wochen	Anzahl der Seren	ELISA - Titer					GMT	AGP pos.	% pos.AGP
		neg.	10[a]	100	1000	10000			
13	29	19	4	4	1	-	3	-	-
14	AE - Impfung								
18	30	-	4	7	8	11	736	-	-
22	12 Pool-Seren je 5 Seren	-	-	1	1	10	5623	1	-
30	30	-	-	1	9	20	4299	3.	10
38	30	-	1	1	8	20	3687	5	16,6
46	30	-	-	3	11	16	2712	9	30
54	30	-	-	2	12	16	2928	4	13,3

a = reziproker Wert der Serumverdünnung

GMT = geometrischer mittlerer Titer

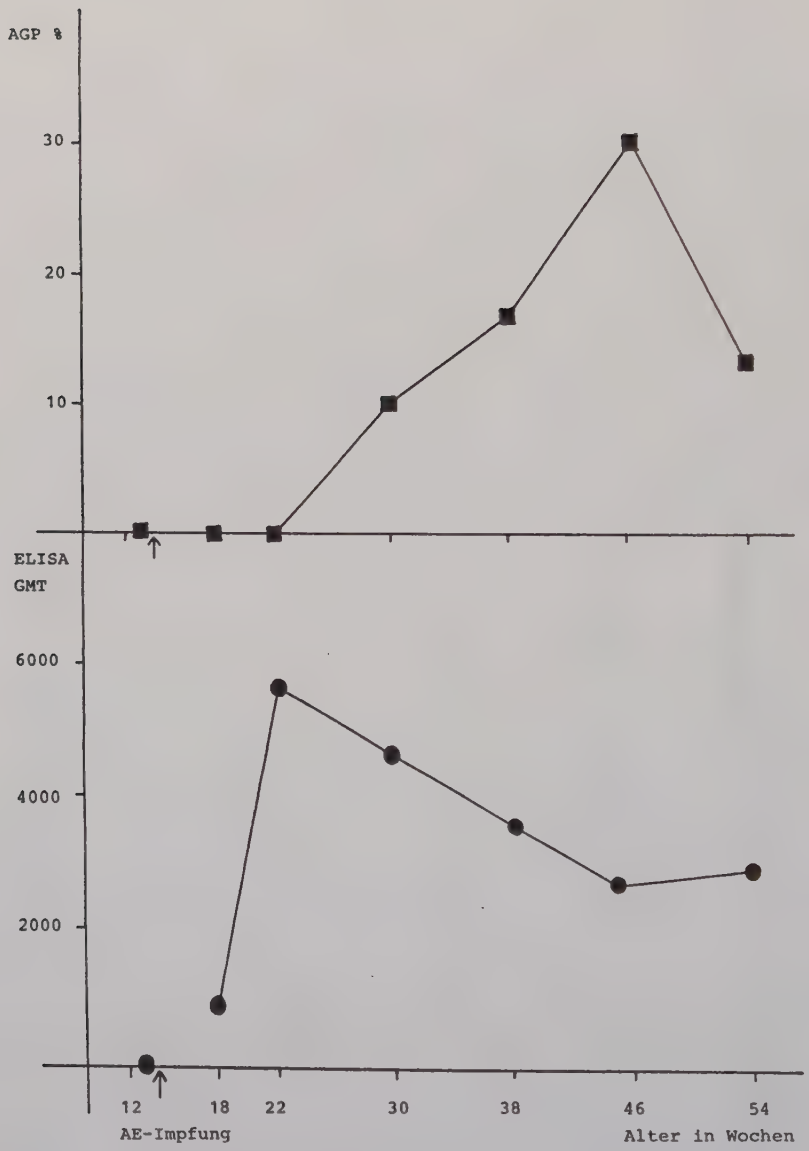
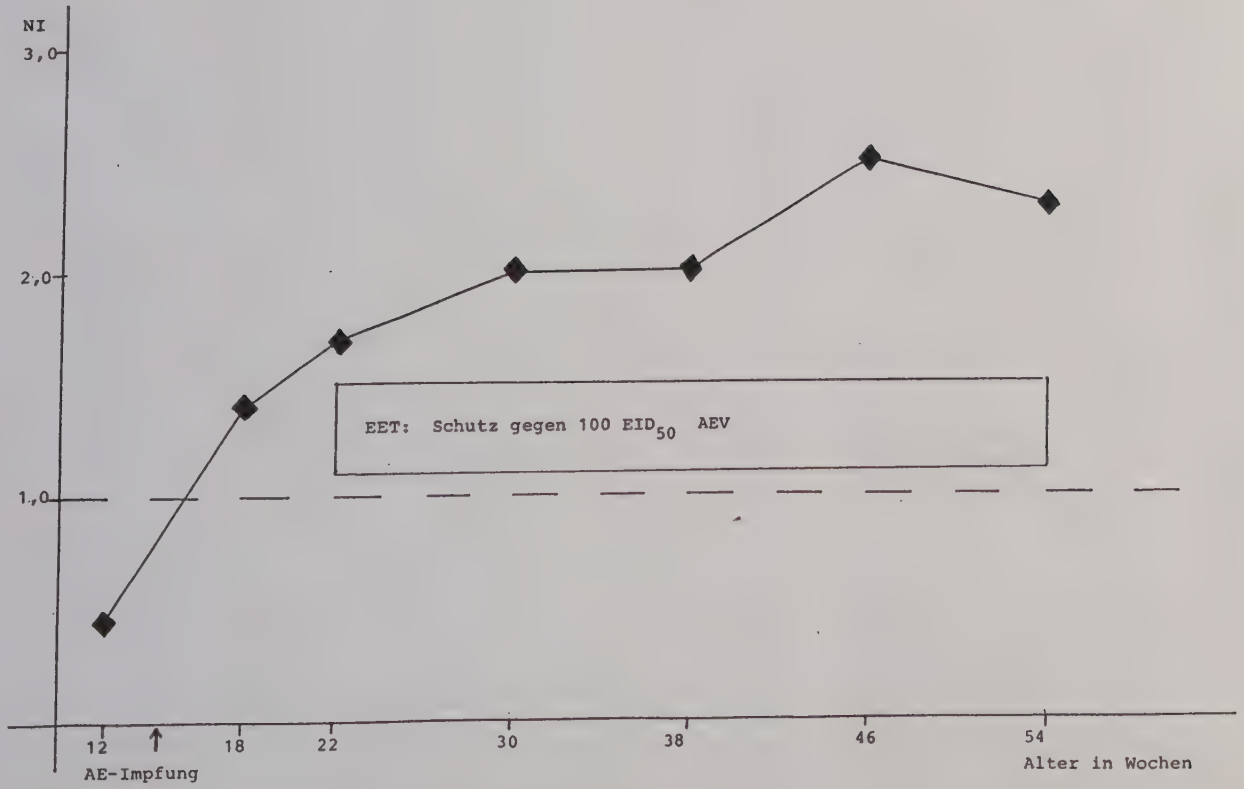


Abb. 3: Verlauf der AEV-Antikörper in Farm C.

4.4 Ergebnis der Virus-Neutralisation

Nach den serologischen Untersuchungen im ELISA und dem AGP standen für den SN nur noch geringe Serum-Mengen zur Verfügung. Der Neutralisationsindex für die verschiedenen Wochen wurde so aus gepoolten Seren aller 3 Legeherden bestimmt. 3 bis 4 Wochen nach der durchgeführten AE-Impfung war ein Neutralisationsindex von 1,4 festzustellen. Der höchste Neutralisationsindex wurde in der 30./31. postvakzinalen Woche mit 2,5 bestimmt. Vor der AE-Impfung betrug der Neutralisationsindex nur 0,45 (Abb. 4) und liegt damit unter der Grenze der Spezifität.

Abb. 4: Ergebnis der AEV-Antikörperbestimmung mit SN und EET



NI = Neutralisationsindex

4.5 Vergleichender Antikörpernachweis aus dem Dotter mittels ELISA und dem EET

Zum Embryoempfänglichkeitstest sowie zur Untersuchung der Dotter auf ihren AEV-Antikörpergehalt kamen die Eier zweier Zuchtbetriebe in der 22., 30., 38., 46. und 54. Woche zur Untersuchung.

Tabelle 7 und 8 geben die mit dem ELISA ermittelten Werte an. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt konnten im Dotter Antikörper gegen AEV mit beschriebener Methode nachgewiesen werden. Dagegen erwiesen sich die Nachkommen der beiden untersuchten Herden zu allen Untersuchungszeitpunkten als geschützt gegen 100 EID_{50} AEV (Abb.4).

Tab. 7: Vergleich von ELISA und EET zur AEV-Antikörperbestimmung im Dottersack (Farm I)

Alter in Wochen	EET	Elisa-Methode a = 10 OD vd	OD neg	ΔOD	100 OD vd	OD neg	ΔOD	1000 OD vd	OD neg	ΔOD	10000 OD vd	OD neg	ΔOD
22	Embryonen resistent gegen 100 EID AEV	0,654	0,553	0,101	0,473	0,408	0,065	0,426	0,388	0,038	0,401	0,378	0,023
30		0,547	0,500	0,047	0,459	0,415	0,046	0,443	0,409	0,034	0,439	0,403	0,036
38		0,558	0,526	0,032	0,466	0,427	0,039	0,433	0,401	0,032	0,418	0,400	0,018
46		0,056	0,052	0,004	0,496	0,461	0,035	0,464	0,441	0,023	0,460	0,440	0,020
54		0,0498	0,465	0,035	0,494	0,460	0,034	0,464	0,441	0,023	0,436	0,421	0,015

a = reziproker Wert der Dotterverdünnung
OD neg = optische Dichte mit neg. Dottermaterial
OD vd = optische Dichte mit verdächtigem Dottermaterial
ΔOD = OD vd - OD neg. - Kontrolle

Tab. 8: Vergleich von ELISA und EET zur AEV-Antikörperbestimmung im Dottersack (Farm II)

Alter in Wochen	EET	ELISA-Methode a = 10			100			1000			10000		
		OD vd	OD neg	ΔOD	OD vd	OD neg	ΔOD	OD vd	OD neg	ΔOD	OD vd	OD neg	ΔOD
22	Embryonen resistent gegen 100 EID 50 AEV	0,510	0,421	0,089	0,459	0,407	0,052	0,452	0,407	0,046	0,446	0,400	0,040
30		0,486	0,440	0,037	0,433	0,412	0,021	0,431	0,410	0,021	0,421	0,400	0,017
38		0,560	0,451	0,109	0,509	0,448	0,061	0,498	0,441	0,057	0,446	0,402	0,044
46		0,532	0,437	0,095	0,500	0,421	0,079	0,471	0,418	0,063	0,445	0,402	0,043
54		0,497	0,429	0,068	0,488	0,421	0,067	0,469	0,416	0,053	0,442	0,410	0,032

a = reziproker Wert der Dotterverdünnung
OD neg = optische Dichte mit neg. Dottermaterial
OD vd = optische Dichte mit verdächtigem Dottermaterial
ΔOD = OD vd - OD neg. - Kontrolle

5. Besprechung der Ergebnisse

Die Serodiagnostik der aviären Encephalomyelitis war bislang unbefriedigend wegen des großen Zeit- und Materialaufwandes bis zum Vorliegen des Ergebnisses der SN bzw. des EET. Versuche, durch eine AGP die Untersuchungszeit zu verkürzen und unabhängig von befruchteten Hühnereiern zu machen, ergaben, daß trotz Konzentration und Teilreinigung des Antigens die Methode sehr wenig empfindlich war.

Die Adaptierung der ELISA-Methode unter Verwendung eines teilgereinigten konzentrierten Antigens aus infiziertem Embryonalgehirn, wie es ULLOA (1980) für den AGP entwickelt hatte, erwies sich als brauchbar. Durch Einstellung des konzentrierten Antigens in der Schachbrett-Titration ergab sich, daß die verwendeten Antigenpräparationen auf das Ausgangsvolumen vor der Konzentration verdünnt werden konnten. Damit ist die Antigenausbeute gegenüber dem Präzipitations-Antigen 10-fach höher. Eine Quantifizierung der Aussage in dem ELISA ist darüberhinaus möglich. In der in dieser Arbeit verwendeten Serumverdünnungsmethode wurdendie Vorteile des ELISA nicht voll ausgeschöpft, da auch über die Extinktion und Verwendung nur einer Serumverdünnungsstufe eine zumindest semiquantitative Aussage möglich wäre. Diese Modifizierung sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Die Haltbarkeit und Lagerfähigkeit vorbereiteter beschichteter ELISA-Platten führte zu wenig befriedigenden Ergebnissen, da eine Lagerfähigkeit bei 4°C nur bis 4 Wochen bzw. bei -20°C bis 5 Wochen ohne Aktivitätsverlust festgestellt werden mußte. Die Überprüfung der Lagerung bei tieferen Temperaturen (-70°C) könnte vielleicht bessere Ergebnisse bringen. Erfahrungsgemäß ist jedoch die Lagerkapazität an den Untersuchungsstellen bei dieser Tieftemperatur immer begrenzt und aus diesem Grunde eine solche Lagerung nicht realisierbar.

Die vorgelegten Untersuchungen wurden mit Seren verschiedener Hühnerherden durchgeführt und mit der Agar-Gel-Präzipitation verglichen. Die Ergebnisse mit der letztgenannten Methode be-

stätigten weitgehend die Feststellungen von ULLOA (1980) und KÖSTERS und ULLOA (1981). Eine Übereinstimmung zwischen AGP und ELISA besteht nur tendenziell. Dieses könnte möglicherweise durch unterschiedliche Antikörper und Antigenkomponenten, die bei den beiden serologischen Verfahren wirksam werden, erklärt werden. Bei dem Vergleich von ELISA und SN konnte festgestellt werden, daß beide Methoden genügend hohe Sensivität besitzen, um eine quantitative Aussage machen zu können. Titerausbildung und -verlauf sind auch bei diesen beiden Methoden unterschiedlich. Hierfür könnten die vorher benannten Faktoren verantwortlich sein.

Der Nachweis von Antikörpern aus dem Dottersack mit Hilfe des ELISA erwies sich als relativ ungenau. Trotz der Chloroform-Reinigung des entnommenen Dottermaterials ließ sich dieses nicht mit dem Serum vergleichen. Möglicherweise müßte für Dotterantikörper eine eigene optimierte Methode entwickelt werden. Wie BIDWELL und BUCK (1976) und VOLLER et al. (1977) betonen, muß für jedes neue Anwendungsgebiet der ELISA gesondert optimiert und standardisiert werden.

Die vielfach in der Literatur beschriebene störende Hintergrundfärbung konnte auch bei der AE-ELISA beobachtet werden. Sie trat besonders bei den Seren in den niedrigen Verdünnungsstufen auf. Bei den hohen erhaltenen Titern können diese Stufen jedoch vernachläßigt werden. Diese Beobachtung entspricht den Aussagen von SLAGHT et al. (1978) und MARQUARDT et al. (1980) bei der Anwendung der Methode mit anderen Antigenen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß der AE-ELISA für die Praxis viele Vorteile bietet, insbesondere auch deshalb, weil man nicht auf Bruteier angewiesen ist und somit auch Legehennen und Jungtiere untersuchen kann. Die Abklärung von Leistungseinbrüchen, die in der Praxis immer wieder beobachtet werden und oftmals nicht abgeklärt werden können, wird damit erleichtert bzw. ermöglicht.

6. Zusammenfassung

Auf Grundlage eines teilgereinigten und konzentrierten AEV-Antigens aus infiziertem embryonalen Gehirn wurde ein ELISA entwickelt. In vergleichenden Untersuchungen mit AGP, SN und EET wurde festgestellt, daß der ELISA eine genügend hohe Sensitivität besitzt, um quantitative Aussagen machen zu können. Die Methode ist empfindlicher als der AGP. Der ELISA ist für die routinemäßige Untersuchung von Hühnerseren auf Antikörper gegen AEV geeignet. Die Lagerfähigkeit beschichteter vorbereiteter ELISA-Platten ist auf 4 Wochen bei +4°C bzw. 5 Wochen bei -20°C beschränkt.

The Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Antibodies against the Avian Encephalomyelitis-Virus (AEV)

Summary

The present work was concerned with assessing an ELISA on the basis of a partially purified and concentrated AEV-antigen from infected embryonic brain tissue.

In comparison with the agar-gel-precipitin-test (AGP) , serum neutralization test and embryo susceptibility test it was shown that the ELISA is sensitive enough to ensure a quantitative result. The method is more sensitive than AGP . The ELISA ist suitable for the routine diagnosis of AEV-antibodies in chicken sera.

The storage of antigen covered prepared ELISA plates is possible for 4 weeks at 4°C and for 5 weeks at -20°C.

El uso de un ensayo inmunosorbente ligado a la enzima (ELISA) para la detección de anticuerpos contra el vi - rus de la encefalomielitis aviar.

Resumen

En base de un antígeno parcialmente purificado y con - centrado del virus de la encefalomielitis aviar prepa - rado con cerebro infectado de embriones de pollo se de - sarrollaron un ensayo inmunosorbente ligado a la enzima (ELISA). En examen comparativo aplicando los métodos de precipitación en gelosa, de neutralisación de suero y susceptibilidad embrionaria se confirmaron que ELISA tiene una sensitividad suficiente para cuantificar la tasa de anticuerpos. El método adoptado es más sensible que la prueba de precipitación en gelosa y apta para exá - menes serológicos de rutina para detectaranticuerpos con - tra el virus de la encefalomielitis aviar. El almacemiento de las placas de microtítulo ya adsorbidas con el antígeno se limita a 4 semanas en refrigeración de 4°C o 5 semanas de -20°C respectivamente.

7. Literaturverzeichnis

Alexander, D.J.
Chettle, N.J.
Procedures for the haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus
Avian Pathol. 6, 9-17, 1977

Ambroise-Thomas, P.
Desgeorges, P.T.
Diagnostic immunoenzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une mi - crométhode modifiée 1. Modalités tech - niques
Bull. O.M.S. 56, 609-613, 1978

Avrameas, S.
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde
Immunochemistry 6, 43-52, 1969

Avrameas, S.
Ternynck, T.
Guesdon, J.L.
Coupling of enzymes to antibodies and antigens
Scand.J. Immunol. 8, Supplement No. 7 7-23, 1978

Barber, C.W.
A genetic influence on cataract for - mation among white leghorn incrosses following on outbreck of avian encepha - lomyelitis
Avian Dis. 7, 495-500, 1963

Belanger, L.
Sylvestre, C.
Dufour, D.
Enzyme-linked immunoassay for alpha - feto-protein by competitive and sandwich procedures
Clinica Chimica Acta 48, 15-18, 1973

Berger, R.G.
An in vitro assay for quantifying the virus of avian encephalomyelitis
Avian Dis. 26, 534-541, 1982

Bergmann, V.
Zur Histopathologie und Pathogenesis der aviären Encephalomyelitis
Mh.Vet.Med. 25, 17-22, 1970

Bidwell, D.E.
Buck, A.A.
The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Bull.WHO 54, 129-139, 1976

Burke, C.N.
Krauss, H.
Luginbuhl, R.E.
The multiplication of avian encephalomye - litis virus in chicken embryo tissues
Avian Dis. 9, 104-108, 1965

Butterfield, W.K.
Characterization of the virus of avian encephalomyelitis
Ph.D.Thesis, Univ.Conn, 1967

Butterfield, W.K.
Helmboldt, C.M .
Luginbuhl, R.E.
Studies on avian encephalomyelitis
IV. Early incidence and longevity of histopathologie lesion in chicken.
Avian Dis. 13, 53-57, 1969

Calnek, B.W.
Committee report on a tentation program for the control of avian encephalomyelitis
Avian Dis. 5, 456-460, 1961

Calnek, B.W.
Jehnich, H.
Studies on avian encephalomyelitis
I. The use of a serum-neutralization test in the detection of immunity levels
Avian Dis. 3, 95-104, 1959

Calnek, B.W.
Taylor, P.J.
Sevoian, M.
Studies on avian encephalomyelitis
IV. Epizootiology
Avian Dis. 4, 325-347, 1960

Choi, W.
Miura, S.
Indirect fluorescent antibody techniques for the detection of avian encephalomye - litis antibody in chicken
Avian Dis. 16, 949-951, 1972

Chubb, R.C.
Churchill, A.E.
Precipitating antibodies associated with Marek's disease
Vet.Rec. 83, 4-7, 1968

Chuc-Ho-dinh, Ebner, D. Zlotowicz, Ch.
Zur Serodiagnostik der Aviären Encephalomye - litis
Mh. Vet.-Med. 37, 118, 1982

Compans, R.W. Klenk, H.D. Caliguiri, L.A. Choppin, P.W.
Influenza virus proteins
I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins
Virology 42, 880-889, 1970

Crowle, A.
J. Immunodiffusion
Academic Press, New York 289-293, 1973

Dawsen, G.J. Orsi, L.N. Yates, V.J. Chang, P.W. Pronovost, A.D.
An enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian adeno - virus and avian adenovirus associated virus
Avian Dis. 24, 393-402, 1980

Dorn, P. Kronthaler, O.
Beobachtungen bei Durchseuchung von Zucht - herden mit dem Erreger der aviären Ence - phalomyelitis
Arch. Gflkd. 28, 49-56, 1964

Engvall, E. Perlman, P.
Elisa quantitative assay of immunglobulin G
Immunochem. 8, 871-874, 1971

Engvall, E. Ruoslathi, E.
Principles of Elisa and recent applications to the study of molecular interactions in immunoassays in the clinical laboratory
89-97, 1979
Ed.: Nakamura, R.M., Dito, W.R. and Tucker, E.S.
Alan R. Liss, Inc., New York

Fadly, A.M.
Relative efficiency of test procedure to detect lymphoid leukosis virus infection
Poultry science 60, 2037-2044, 1981

Feibel, F.
Helmboldt, C.F.
Jungherr, E.L.
Carlson, J.R.
Avian encephalomyelitis. Prevalence pathogenicity of the virus and breed susceptibility
Am.J.Vet.Res. 13, 260-266, 1952

Garcia, Z.
Bankowski, R.A.
Comparison of a tissue culture virus neutralization - test and the enzyme linked immunosorbent of antibodies to infectious bronchitis
Avian Dis. 25, 121-129, 1981

Geller, J.
Heinert, H.H.
Kühne, H.
Problemebei der Bewertung des Enzyme - linked Immunosorbent Assay, verursacht durch Hintergrundreaktionen
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 94, 36-37, 1981

Gilman, S.C.
Docherty, J.J.
Detection of antibodies specific for herpes simplex virus in human sera by the enzyme linked immunosorbent assay
J.Inf.Dis. 136, 286-293, 1977

Girschick, T.
Crary, J.C.K.
Preparation of an agar-gel precipitating antigen for avian-encephalomyelitis and its used in evaluating the antibody status of poultry
Avian Dis. 26, 798-804. 1982

Groth, W.
Greuel, E.
Zum Auftreten der ansteckenden Gehirn - Rückenmark-Entzündung in rheinischen Geflügelbeständen
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 68, 524,529,1961

Halpin, F.B.
Depression of egg yield associates with infection by the virus of infectious avi encephalomyelitis
Report of six outbreak
Veterinarian 4, 161-167, 1967

Heide, van der L.
The fluorescent antibody technique in the diagnosis of avian encephalomye - litis
University of Maine
Technical Bulletin 44, 1970

Hemsley, L.A.
The incidence of infectious avian en - cephalomyelitis ("epidemic tremor') in broiler breeding flocks and its econo - mic effect
Veterinarian 2, 193-201, 1964

Hill, R.W.
Raymond, R.G.
Apparent natural infection of coturnix quail hens with the virus of avian en - cephalomyelitis
Case-report
Avian Dis. 6, 226-227, 1962

Hohlstein, W.M
Deshmukh, D.R.
Larsen, C.T.
Sautter, J.H.
Pomeroy, B.S.
Mc. Dowell, J.R.
An epiornithic of avian encephalomye - litis in turkeys in Minnesota
AmJ.Vet.Res. 31, 2233-2242, 1970

Ignjatovic, J.
Bagust, T.J.
Detection of avian leukosis virus with the Elisa system. Evaluation of conjugation methodology and comparison of sensitivity with the phenotypic mi - xing test in commercial layer-flocks
Avian Pathol. 11, 579-591, 1982

Ikeda, S.
Immunodiffusion test in avian encepha - lomyelitis
I. standardization of procedure and de - tection of antigen in infected chick and embryo
Nat.Inst.Ani.Hlth.
Quart. 17, 81-87, 1977 a

Ikeda, S. — Immunodiffusion test in avian encephalo - myelitis II, detection of precipitating antibody in infected chicken in comparison with neu - tralizing antibody Nat.Inst.Ani.Hlth. Quart. 17, 88-94, 1977 b

Jones, E.E. — An encephalomyelitis in the chicken Science 76, 351, 1932

Jones, E.E. — Epidemic tremor, an encephalomyelitis affec - ting young chicken J. Exp.Med. 59, 781-198, 1934

Jungherr, E.L. Sumner, F. Luginbuhl, R.E. — Pathology of egg-adapted avian encephalo - myelitis Science 124, 80-81, 1956

Kaleta, E.F. Brozeit, H.E. Neumann, M. Plöger, W. — Vergleichende Untersuchungen von Virusstämmen der aviären Encephalomyelitis aus Huhn und Pute Dtsch.tierärztl.Wschr. 82, 195-197, 1975

Kamada, M Sato, G. Miura, S. — Characterization of multiplication of em - bryo-adapted avian encephalomyelitis virus in chick embryo brain cell cultures Jap.J.Vet.Res. 22, 32-42, 1974

Kösters, J. Ulloa, J. — Zur AE-Überwachung von Legehennenbeständen mit Hilfe der Agar-Gel-Präzipitation Der prakt. Tierarzt, Sonderdruck 62. Jahrgang 1981, Heft 12, 1079 ff

Krauss, H.
Ueberschär, S.
Zur Ultrastruktur des Virus der aviären Encephalomyelitis
Berl.Münch. tierärztl. Wchschr. 79, 480-482, 1963

Leinikki, P.O.
Enzyme linked immunosorbent assay deter - mination of specific rubella antibody levels in micrograms of immunoglobulin G per milli - liter of serum in clinical sample
J.Clin.Microbiol. 8, 419-423, 1978

Lucas, A.M.
Lymphoid tissue and its relationship to so called normal lymphoid foci and to lymphoma - tosis
I. qualitative study of dove and pigeon
Poultry Sci. 30, 116-124, 1951

Luginbuhl, R.E.
Helmboldt, C.F.
Epidemic tremor in: Disease of Poultry, ed.: M.S. Hofstad
Iowa State University Press, Ames, USA, 1978

Lukert, P.D.
Davis, R.B.
An antigen used in the agar-gel precipita - tion reaction to detect avian encephalomye - litis virus antibody
Avian Dis. 15, 935-938, 1971

Mancini, L.O.
Yates, V.J.
Cultivation of avian encephalomyelitis virus in vitro
I. in chick embryo neuroglial cell culture
Avian Dis. 11, 672-679, 1967

Mancini, L.O.
Yates, V.J.
Cultivation of avian encephalomyelitis in vitro
II. in chick embryo fibroblastic cell culture
Avian Dis. 12, 278-284, 1968 a

Mancini, L.O.
Yates, V.J.
Cultivation of avian encephalomyelitis virus in chicken embryo kidney cell culture
Avian Dis. 12, 686-688, 1968 b

Marquardt
Johnson, R.B.
Odenwald, W.F.
Schlotthober,B.A.
An indirect enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus
Avian Dis. 24, 375-385, 1980

Mathey, W.J.J.
Avian encephalomyelitis in pheasants
Cornell Vet. 45, 89-93, 1955

Matheka, H.D.
Mayr, A.
Bögel, K.
Zbl. Bakt. I.Orig. 187, 137-143, 1962

Mathiesen, L.R.
Feinstone, S.M.
Wong, D.C.
Skinhoej, P.
Purcell, R.H.
Enzyme linked immunosorbent assay for detec - tion of hepatitis A-antigen in stool and an - tibody to hepatitis A-antigen in sera, com - parison with solid phase radioimmunoassay, immune electron microscopy and immune adhe - rence haemagglutination assay
J.Clin.Microbiol. 7, 184-193, 1978

Mayr, A.
Bachmann, P.A.
Bibrack, B
Wittmann, G.
Virologische Arbeitsmethoden
Band I, II und IV
Gustav Fischer, Stuttgart
New York, 1977

Meulemans, G.
Halen, P.
Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for detecting infectious laryngotracheitis viral antibodies in chicken serum
Avian Pathol. 11, 361-368, 1982

Mockett, A.P.A.
Darbyshire, J.H.
Comparative studies with an enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for antibodies to avian infectious bronchitis virus
Avian Pathol. 10, 1-10, 1981

Nakane, P.K.
Kawaoi, A.
Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation
J. Histochem. Cytochem. 22, 1084-1091, 1974

Okazaki, W.
Purchase, H.G.
Burmester,B.R.
Phenotypic mixing test to detect and assay avian leukosis virus
Avian Dis. 19, 311-317, 1975

Olitzky, P.K.
Bauer, J.H.
Ultrafiltration of the virus of infectious avian encephalomyelitis
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 42, 634-636, 1939

Peckham, M.D.
Lens opacities in fowl possibly associated with epidemic tremor
Case report, Avian Dis. 1, 247-255, 1957

Reed, C.J.
Muench, H.A.
A simple method of estimating fifty per - cent endpoints
Am.J.Hyg. 27, 493-497, 1938

Riggenbach, Chr.
Avian encephalomyelitis in Western Switzer - land
Schweiz.Arch.Tierheilk. 107, 18-21, 1965

Roekel, van H.
Bullis, K.L.
Clarke, M.K.
Preliminary report of infectious avian encephalomyelitis
J.Am.Vet.Med.Ass. 93, 372, 375, 1938

Roekel, van H.
Bullis, K.L.
Clarke, M.K.
Infectious avian encephalomyelitis
Vet.Med. 34, 754, 1939

Sarma, P.S.
Turner, H.C.
Huebner, R.J.
An avian leucosis group specific complement fixation reaction. Application for the de - tection and assay of non cytopathogenic leu - cosis virus
Virology 23, 313-321, 1964

Sato, G.
Watanabe, H.
Miura, S.
An attempt to produce a complement-fi - xation antigen for the avian encephalo - myelitis virus from infected chick embryo brain
Avian Dis. 13, 461-469, 1969

Saunders, G.C.
Clinard, E.H.
Rapid micromethod of screening for an - tibodies to disease agents using the indirect enzyme labeled antibody-test
Clin.Microbiol. 3, 604-608, 1976

Saunders, G.C.
The cut of solid phase enzyme immunoassay including selected protocols in
Immunoassay in the clinical laboratory
99-118, 1979
Editors: Nakamura, R.M.
Dito,W.R.
Tucker, E.S.
Alan R.Liss
Inc, New York

Savigny, de D.
Voller, A.
The communication of Elisa data from la - boratory to clinician
J. Immunoassay 1 (1), 105-128, 1980

Schaaf, K.
Lamoreux, W.F.
Control of avian encephalomyelitis by vaccination
Am.J.Vet.Res. 16, 627-633, 1955

Slaght, S.S.
Yang, T.J.
van der Heide, L.
Adaption of enzyme-linked immunosorbent assay to the avian system
J. Clin. Microbiol. 10, 698-702, 1979

Slaght, S.S.
Yang, T.J.
van der Heide, L.
Fredrickson, T.N.
An enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity
Avian Dis. 22, 802-805, 1978

Springer, W.T.
Schmittle, S.D.
Avian encephalomyelitis
A chronological study of histopathogenesis in selected tissue
Avian Dis. 12, 229-239, 1968

Soula, A.
Moreau, Y.
Antigen requirements and specificity of a microplate enzyme-linked-immunosorbent assay (Elisa) for detecting infections bronchitis viral antibodies in chicken serum
Arch. virol. 67, 284-295, 1981.

Smith, E.J.
Fadly, A.
Okazaki, W.
An enzyme linked immunosorbent assay for detecting avian leukosis virus
Avian Dis. 23, 698-707, 1979

Summer, F.W.
Jungherr, E.L.
Studies on avian encephalomyelitis
I Egg adaption of the virus
Am J.Vet.Res. 18, 717-719, 1957a

Summer, F.W.
Lugenbuhl, R.E.
Jungherr, E.L.
Studies on avian encephalomyelitis
II. Flock survey for embryo susceptibility of the virus
Am.J.Vet.Res. 18, 720-723, 1957 b

Thoen, C.O.
Eacret, W.O.
Himes, E.M.
An enzyme labeled antibody test for detecting antibodies in chickens infected with Mycobacterium serotype 2
Avian Dis 22, 162-166, 1978

Ulloa, J.
Vergleichende Untersuchungen zur Herstellung und Anwendung verschiedener Präzipitationsantigene bei der aviären Enzephalomyelitis
Diss.Vet.Gießen (1980).

Voller, A.
Bidwell, D.
Bartlett, A.
Microplate enzyme immunoassay for the immunodiagnosis of virus infections
Manual of Clin.Immunol. A.S.M.
Washington, D.C., 506-512, 1976

Wallis, C.
Melnick, J.L.
Virology 16, 504-506, 1962

Weemers, van B.K.
Schurrs, A.H.W.M.
Immunoassay using antigen enzym conjugates
FEBS Letters 15, 323, 1971

Weisman, J.
Hitchner, S.B.
Virus neutralization versus agargel precipitin test for detecting serological response to infectious bursal disease virus
Avian Dis. 22, 598-603, 1978

Wills, F.K.
Moulthrop, I.M.
Propagation of avian encephalomyelitis virus in the chick embryo
Southwestern Vet. 10, 39-42, 1956

Wilson, B.M.
Nakane, P.K.
Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies
In immunofluorescence and related staining technique pp. 215-224 (1978)
Edited by Knapp, W.
Huluber, K.
Elsevier, G. Wick
North. Holland Biomedical Press

Herrn Prof.Dr.J.Kösters danke ich herzlich für die Über - lassung des interessanten Themas sowie die unermüdliche Förderung bei der Planung und Auswertung der Versuche.

Herrn Prof.Dr.Fischer, Herrn Dr.von Mylius, Frau Dr. med.vet. Dr.med.vet.habil.H.Gerlach und Frau Krumbach gilt mein Dank für die Unterstützung während meines Aufenthalts in Deutschland.

Herrn R. Richter danke ich für die Betreuung im Viruslabor sowie allen Institutsangehörigen für ihre freundliche Hilfs - bereitschaft.

Mein Dank gilt auch der DSE (Deutschen Stiftung für interna - tionale Entwicklung), die meinen Aufenthalt in Deutschland ermöglichte.

Lebenslauf

Am 28.5.1948 wurde ich, Sunantha Kuhavanta, als Tochter des Pharmazeuten Saeng Kuhavanta und seiner Frau Siri Kuhavanta, geborene Chopangka, in Bangkok/Thailand geboren.

Nach Besuch der Benjamarachalai-Schule in Bangkok von 1955 - 1965 wechselte ich auf das dortige Gymnasium über, an dem ich 1967 die Reifeprüfung bestand.

1967 - 1974 studierte ich an der Chulalongkorn-Universität Bangkok im Fachbereich Tiermedizin und legte 1974 dort das Tierärztliche Examen ab. Die Approbation als Tierärztin erhielt ich im selben Jahr.

1974 trat ich in die Abteilung der Geflügelkrankheiten des Departments of Livestock Development, Bangkok ein.

Von 1977 - 1979 arbeitete ich als Tierärztin bei der FAO (Food and Agriculture Organization).

Ein Stipendium der DSE (Deutsche Stiftung für internationale Entwicklung) ermöglichte mir die Ausbildung am Institut für Geflügelkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München.

1981 immatrikulierte ich mich zur Promotion an der dortigen tierärztlichen Fakultät.

Mit den Arbeiten zur vorgelegten Dissertationsarbeit begann ich 1981.